

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra parazitologie

Studijní program Biologie
Studijní obor Parazitologie



Bc. Nikola Polanská

**Role *Sergentomyia schwetzi* v epidemiologii viscerální
leishmaniózy v Etiopii a leishmanióza u psů v Rumunsku**

The role of *Sergentomyia schwetzi* in visceral leishmaniasis foci
in Ethiopia and canine leishmaniasis in Romania

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Iva Kolářová, Ph.D.
Školitel specialista: Doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 08. 2013

Nikola Polanská

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce RNDr. Ivě Kolářové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost a předávání cenných rad a zkušeností. Mé poděkování patří také mému školiteli specialistovi Doc. RNDr. Janu Votýpkovi, Ph.D. V neposlední řadě patří moje velké poděkování rodině a mé přítelkyni za podporu v průběhu mého studia.

Abstrakt

Viscerální leishmanióza je onemocnění způsobené prvokem z komplexu druhů *Leishmania donovani* (Kinetoplastida). V zemích východní Afriky jsou zaznamenány jedny z nejhorších epidemií tohoto onemocnění na světě. Ve starém světě jsou leishmanie napadající savce, včetně člověka, obecně přenášeny vektory rodu *Phlebotomus*, zatímco takzvané plazi leishmanie jsou přenášeny rodem *Sergentomyia*.

V první části této práce předkládáme souhrn výsledků ze studií a pokusů zaměřených na protilátkovou odpověď proti slinám druhu *Sergentomyia schwetzi* u domácích zvířat v severní Etiopii, která by nám mohla objasnit otázku, zdali flebotomové tohoto rodu sají i na teplokrevných zvířatech. Pomocí sérologického vyšetření jsme potvrdili hypotézu, že druh *S. schwetzi*, preferenčně sající na plazech, také saje na teplokrevných obratlovcích a mohl by tak hrát roli v přenosu i savčích leishmanií.

V druhé části diplomové práce se zaměřujeme na detekci prvoka *Leishmania infantum* z komplexu *Le. donovani* u psů z Rumunska. Pomocí specifických primerů proti kinetoplastové DNA *Leishmania* sp. jsme v žádném vzorku krve psů z Rumunska nezjistili přítomnost leishmaniové DNA. Sérologicky však byla téměř všechna vyšetřená psí séra pozitivní na protilátky proti *Le. infantum*.

Klíčová slova: *Sergentomyia*, *Leishmania*, viscerální leishmanióza, ELISA, Etiopie, Rumunsko

Abstract:

Visceral Leishmaniasis is a disease caused by protozoan pathogen of *Leishmania donovani* complex (Kinetoplastida). There are some of the worst recorded outbreaks of the disease in the countries of East Africa. In the Old world the Phlebotominae sand flies of the genus *Phlebotomus* are vectors of *Leishmania* parasites, the causative agent of leishmaniasis that can affect vertebrates, including humans and veterinary important animals, while the so-called reptilian *Leishmania* are transmitted by the genus *Sergentomyia*.

In the first part of this master thesis we present a summary of the results of studies and experiments focused on antibody response to saliva of the species *Sergentomyia schwetzi* of domestic animals in northern Ethiopia, that we could clarify the question whether sand flies of this genus take blood on warm-blooded animals. Using serological tests have confirmed the hypothesis that the species *S. schwetzi*, preferentially blood-taking on the reptiles, also takes blood on the warm-blooded vertebrates and might play a role in the transmission and mammalian *Leishmania*.

In the second part of this thesis, we focus on the detection of protozoan *Leishmania infantum* (complex of *Le. donovani*) in dogs from Romania. We use specific primers against the kinetoplast DNA of *Leishmania* sp. but in no sample of blood from Romania dogs was detect *Leishmania* DNA. On the other hand, in the serological tests on anti-*Leishmania* antibodies were almost all examined canine sera positive for these antibodies.

Key words: *Sergentomyia*, *Leishmania*, Visceral Leishmaniasis, ELISA, Ethiopia, Romania

Obsah

1. Úvod a cíle práce	8
2. Literární přehled.....	10
2.1. Úvod do biologie flebotomů	10
2.2. Flebotomové rodu <i>Sergentomyia</i>	12
2.2.1. Geografické rozšíření flebotomů rodu <i>Sergentomyia</i>	13
2.2.2. Flebotomové rodu <i>Sergentomyia</i> a přenos patogenů	15
2.3. Leishmanióza	19
2.3.1. Viscerální leishmanióza v oblasti východní Afriky se zaměřením na Etiopii	20
2.3.2. Viscerální leishmanióza v oblasti Rumunska	25
3. Materiál a metodika	26
3.1. Chov flebotomů.....	26
3.2. Pitva slinných žláz.....	27
3.3. Odběr zvířecích sér a krve	28
3.3.1. Odběr sér domácích zvířat v Etiopii.....	28
3.3.2. Odběr krve a séra psů v Rumunsku	29
3.3.3. Odběr sér laboratorních myší.....	30
3.4. Leishmanie	31
3.5. ELISA	32
3.5.1. Stanovení protilátek proti slinám flebotomů	32
3.5.2. Stanovení protilátek proti <i>Le. infantum</i>	33
3.6. Nested PCR	34
3.7. Statistické vyhodnocení	36
4. Výsledky.....	37
4.1. Protilátková odpověď proti pobodání <i>S. schwetzi</i> u domácích zvířat v Etiopii	37
4.1.1. Protilátková odpověď u skotu	38
4.1.2. Protilátková odpověď u ovcí	39
4.1.3. Protilátková odpověď u koz	40
4.1.4. Protilátková odpověď u oslů	41
4.1.5. Protilátková odpověď u psů	42
4.2. Zkřížené reakce antigenů a protilátek <i>S. schwetzi</i> , <i>P. orientalis</i> a dalších flebotomů.....	44
4.2.1. Zkřížené reakce u psích sér	45
4.2.2. Zkřížené reakce u myších sér.....	47
4.3. Protilátková odpověď proti <i>Le. infantum</i> u psů v Rumunsku.....	49

4.4.	Diagnostika <i>Leshmania</i> sp. v krvi psů z Rumunska pomocí nested PCR	51
5.	Diskuze	52
6.	Závěr	60
7.	Seznam použité literatury	62

1. Úvod a cíle práce

Flebotomové jsou dvoukřídlý hmyz rozšířený v tropických a subtropických pásmech celého světa. Jedná se o přenašeče několika patogenů, mezi nimiž jsou i prvoci rodu *Leishmania*, kteří způsobují významné lidské onemocnění – leishmaniózu. Tato nemoc má různé klinické projevy od méně závažných kožních lézí až po napadení vnitřních orgánů hostitele tzv. viscerální formu. Z epidemiologického hlediska jsou velice důležitá rezervoárová zvířata, na kterých mohou sát neinfekční samice flebotomů a stát se tak infekčními čímž napomáhají cirkulaci leishmanií v dané oblasti, včetně případného přenosu na člověka.

Etiopie je zemí s endemickým výskytem viscerální formy leishmaniózy, kterou způsobuje *Leishmania donovani*. Předpokládaným vektorem *Le. donovani* v této oblasti je *Phlebotomus orientalis*, ovšem nejvíce zastoupeným rodem flebotoma je rod *Sergentomyia*. Samice sergentomyií preferují pro sání především studenokrevné obratlovce, avšak u některých druhů bylo zaznamenáno sání i na teplokrevných obratlovcích. Z tohoto důvodu by bylo přínosné ověřit, zdali samice *Sergentomyia schwetzi* sají i na teplokrevných obratlovcích – především na domácích zvířatech, které žijí v těsné blízkosti lidí – a zdali tak mohou být případně zapojeny do šíření leishmaniózy i mezi teplokrevnými obratlovci, včetně člověka.

V druhé části této práce je charakterizována problematika viscerální leishmaniózy v Evropě, konkrétně v Rumunsku, kde je toto onemocnění způsobeno leishmaniemi druhu *Le. infantum* (komplex *Le. donovani*). V posledních letech zde však nebyly u lidí autochtonní nákazy viscerální leishmaniózou zaznamenány, avšak *Le. infantum* byla detekována u psů z této oblasti, kteří jsou prokázaným rezervoárovým zvířetem nákazy *Le. infantum* (Hamel and kol. 2012). Z tohoto důvodu jsme testovali séra psů z Rumunska na protilátky proti antigenům *Le. infantum*. Serologické vyšetření jsme doplnili molekulární diagnostickou metodou, kdy jsme ve vzorkách krve těchto psů pomocí specifické PCR amplifikace rozeznávali kinetoplastovou DNA *Leishmania* sp. Výsledky těchto pokusů by mohly pomoci s mapováním případů psí leishmaniózy v Rumunsku.

Hlavní cíle této diplomové práce jsou:

1. zjistit, jestli na domácích zvířatech v severní Etiopii sají flebotomové druhu *Sergentomyia schwetzi* pomocí sérologického vyšetření
2. zjistit, jestli jsou psi v Rumunsku nakaženi prvokem *Leishmania* spp. pomocí sérologického vyšetření a *Leishmania* specifické PCR amplifikace

2. Literární přehled

2.1. Úvod do biologie flebotomů

Flebotomové jsou drobný dvoukřídlý hmyz patřící do podčeledi Phlebotominae (Psychodidae, Nametocera, Diptera), obývajících většinu subtropických a tropických oblastí světa. Pásmo jejich rozšíření však zasahuje i do mírného podnebného pásma a to v geografických hranicích jejich výskytu, kterými je 50° s.š. a 40° j.š. (Perfilev 1968). Nejseverněji se vyskytují na severoamerickém kontinentě v jihozápadní Kanadě (Young and Perkins 1984), v Evropě v oblasti severní Francie a na asijském kontinentu byl jejich nejsevernější výskyt zaznamenán v Mongolsku (Lewis 1982). Zatím žádný z druhů nebyl zaznamenán na Novém Zélandu a ostrovech v Tichém oceánu, stejně tak v Austrálii nenajdeme žádný medicínsky významný druh flebotoma (Lane 1993). Výskyt flebotomů byl zaznamenán v nadmořské výšce pod úrovní moře (Lane 1993) až do 3000 m n. m. v Afghánistánu (Artemiev 1980 citováno podle Killick-Kendrick 1999).

Do podčeledi Phlebotominae náleží přibližně 800 druhů flebotomů, kteří jsou rozdělení do šesti rodů, které se liší morfologicky, geografickým rozšířením i životními strategiemi (shrnutí podle Maroli and kol. 2013). Z pohledu veterinární a humánní medicíny jsou nejdůležitější rody *Phlebotomus*, *Chinius* a *Sergentomyia*, které se vyskytují v oblasti Starého světa, zatímco rod *Lutzomyia* je výhradně rozšířen v Novém světě, kde nalezneme ještě další dva rody, které nemají medicínský či veterinární význam – r. *Brumptomyia* a r. *Warileya* (Seccombe and kol. 1993, Young and Duncan 1994).

Flebotomové jsou schopni přežívat v různých typech biotopů, od vlhkých deštných pralesů až po oblasti polopouští a pouští. Jejich výskyt v daných lokalitách je často ohniskový, což je do značné míry ovlivněno i tím, že nejsou zdatnými letci. Většinou létají na krátké vzdálenosti v řádech desítek až stovek metrů, avšak byly zaznamenány i delší přelety, pro které nejspíše využívají vzdušných proudů, což je pravděpodobně i příčinou jejich náletů na sledovanou lokalitu ve vlnách (Ashford 1974, Lewis 1982).

Stejně tak jako ostatní diptera patří i flebotomové do skupiny hmyzu s holometabolní proměnou. Samice flebotomů kladou vajíčka na vlhká stinná místa, často do nor a hnízd drobných savců. Z vajíček se postupně vyvíjejí čtyři larvální stádia následované stádiem kukly, ze které se po určité době líhnou dospělci. Larvy flebotomů se živí organickým

detritem, jehož složení a složení okolní půdy do značné míry larvy ovlivňuje (Bettini and Melis 1988). Dospělci přijímají potřebné živiny sáním různých cukerných šťáv. Samice navíc potřebují proteiny z krve, které jsou nezbytné pro dokončení gonotrofických cyklů. Tuto krev získávají sáním jak homoiotermních, tak i poikilotermních živočichů, mezi kterými mohou sáním přenášet různé patogenní agens (Lane 1993).

Jedním z nejzávažnějších patogenů přenášeným flebotomy jsou prvoci patřící do rodu *Leishmania*, kteří způsobují onemocnění zvané leishmanióza, jemuž se dále věnuji v kapitole 2.3.

Dalším onemocněním, za jehož přenos jsou zodpovědní flebotomové je Carrionova nemoc (nemoc Rocha-Lima, bartonelóza). Toto onemocnění způsobuje gram negativní bakterie *Bartonella bacilliformis* ze skupiny alfa proteobakterií a je rozšířeno v Jižní Americe v oblastech Ekvádoru, Kolumbie a Peru. Nejprve se projevuje horečnatou akutní fází zvanou horečka Oroya, kdy je pacient postižen hemolytickou anémií v důsledku napadání krvinek bakteriemi. Tato fáze má až 88% smrtnost. Po týdnech až měsících dochází k přechodu na chronickou fázi nemoci (Verruga peruana), která se projevuje vznikem kožních vřídků, připomínající bradavice. Toto onemocnění je v Peru přenášené flebotomy druhu *L. verrucarum* (shrnutí v Hambuch and kol. 2004), v Kolumbii je pravděpodobným vektorem *L. colombiana* (Lane 1993).

Flebotomové jsou také vektory různých virů patřících do skupin flebovirů, vesikulovirů a orbivirů. Skupina virů náležících do rodu *Phlebovirus* (Bunyaviridae) se projevuje jako onemocnění nazvané flebotomí horečka (Sand-fly fever, papataci fever), která se vyskytuje jak v oblasti Starého světa, tak i Nového světa. Případy tohoto nespecifického hořečnatého onemocnění nebyly zaznamenány v Austrálii a jihovýchodní Asii. Hlavními vektory tohoto onemocnění jsou nejspíše *P. papatasi*, *P. perfiliewi* a *P. perniciosus*, na americkém kontinentě pak druhy *L. trapiro* a *L. ylephiletor*. Do skupiny flebovirů náleží více druhů virů způsobujících onemocnění s klinickými příznaky, které jsou podobné chřipce, případně se onemocnění může rozvinout až na meningitidu a meningo-encefalitidu. Do této skupiny patří Sicilian virus, Naples virus, Toscana virus a Punta Toro virus (Depaquit and kol. 2010). Další virové onemocnění přenášené flebotomy je způsobeno virem Chandipura (*Rhabdoviridae*, *Vesiculovirus*). Tento virus způsobuje akutní formu encefalitidy u lidí v Indii, ale byl izolován i z flebotomů rodu *Sergentomyia* v západní Africe. Další druhy vesikulovirů způsobují u zvířat vesikulární stomatitidu, která má

obdobné projevy u zvířat jako nákaza kulhalkou a slintavkou (Geevarghese and kol. 2005, Basak and kol. 2007). Dále jsou flebotomy přenášeny viry ze skupiny *Orbivirus*, které se projevují jako lehká forma chřipky (Depaquit and kol. 2010).

2.2. Flebotomové rodu *Sergentomyia*

Vnitřní taxonomie rodu *Sergentomyia* je stále nejasná, jelikož jednotlivé podrody a druhy jsou špatně morfologicky definovatelné. V současné době náleží k rodu *Sergentomyia* devět podrodů: *Capesomyia*, *Demeillonius*, *Grassomyia*, *Neophlebotomus*, *Parrotomyia*, *Parvidens*, *Sergentomyia*, *Sintonius*, *Spelaeomyia*. Přes 60 dalších druhů není zařazeno do žádného z těchto podrodů (Seccombe and kol. 1993).

Životní cyklus flebotomů rodu *Sergentomyia* je obdobný jako u rodů *Phlebotomus* a *Lutzomyia*. V několika studiích z Afriky bylo prokázáno, že samice sergentomyií nejčastěji kladou vajíčka do termitišť, ve kterých je oproti okolí o něco stálější teplota a vlhkost. Mimo tyto dva faktory byly studie zaměřeny na obsah uhličitánů, iontů, množství písku a prachu a také pH substrátu, ve kterém dochází k vývoji larev. Ukázalo se, že larvy sergentomyií jsou v tomto ohledu velmi přizpůsobivé a tyto chemické a fyzikální faktory nemají přílišný vliv na počty vyletujících dospělců. Mimo termitiště byly nalezeny líhniště i v rozsedlinách stromů a v norách drobných hlodavců (Basimike and Mutinga 1990, Basimike and kol. 1992).

Dospělci sergentomyií vyhledávají přes den místa pro odpočinek a ukrytí. Tato místa musí flebotomům poskytovat stabilní teplotu přes den i v oblastech s velmi vysokými teplotními výkyvy. Často jsou takovými místy jeskyně či pukliny, případně stará rozbořená nebo neobydlená lidská obydlí, která jsou ve větší vzdálenosti od obydlených oblastí. Avšak v několika studiích byly prokázány přesuny flebotomů blíže k lidským obydlím, kde bylo více příležitostí pro sání krve. S tímto přesunem je nejspíše spojena i změna jejich zvyku sát jen na studenokrevných obratlovcích a přechod na příležitostné sání i na obratlovcích teplokrevných (shrnuťo podle Perfilev 1968). Beklemishev (1957) usuzuje, že většina druhů flebotomů je primárně zoofilních, exofilních a exofágických, a pokud přešly některé druhy k antropofágii a případně endofílii, tak je to z důvodu lepších podmínek pro získání krve a tudíž i rozmnožení se (Beklemishev 1957 citováno podle Perfilev 1968). Ke stejnému závěru došel i Killick-Kendrick (1999).

Jak již bylo zmíněno samice flebotomů rodu *Sergentomyia* upřednostňují pro získání krve sání na studenokrevných obratlovcích, jako jsou gekoni, hadi a ještěři (Minter and Wijers 1963, Seccombe and kol. 1993). Některé druhy (*S. kalaharia*, *S. namibiensis*, *S. xera*) v jižní Africe sají i na drobných hlodavcích, například na zemních veverkách, v jejichž norách pravděpodobně žijí (Davidson 1979). Mnoho starších studií prokázalo, že jsou druhy sergentomyií, které na lidech mohou sát ať již příležitostně (*S. arpaklensis*, *S. sogdiana*, *S. grekovi* a *S. squamipleuris*) nebo si vybírají lidi pro sání často, jako je tomu u druhu *S. sumbarica* v Turkmenistánu (shrnutí podle Perfilev 1968). Byly zjištěny i případy kdy jeden druh flebotoma sál na lidech jen v určité lokalitě, *S. clidei* v Súdánu, avšak v Indii na lidech krev nesaje (Lewis and Kirk 1951 citováno podle Perfilev 1968). Z těchto poznatků vyplývá, že flebotomové rodu *Sergentomyia* jsou ve výběru hostitele poměrně přizpůsobivý. Tento fakt jim dává selekční výhodu, kdy jsou schopni využít i jiné hostitele pro sání krve než ty, na které jsou evolučně vázání.

2.2.1. Geografické rozšíření flebotomů rodu *Sergentomyia*

Rod *Sergentomyia* se vyskytuje v Evropě, Africe, Asii a Austrálii.

V Africe se vyskytují druhy podrodu *Capensomyia*, jehož typovým zástupcem je *S. drakensbergi*, které se dělí na dvě skupiny: (i) skupina *namibiensis* s výskytem v západní části jižní Afriky, Namibii, zahrnuje například druhy *S. kalaharia* a *S. xera* (ii) skupina *caffarica* s výskytem ve východní části jižní Afriky a Zimbabwe, do které patří například *S. meeseri* (Davidson 1979, 1983).

Dalším podrodem z jižní Afriky je podrod *Demeillonius* s typovým rodem *S. transveelensis* (Davidson 1980).

Zástupci podrodu *Grassomyia* se vyskytují v Africe, na Blízkém Východě a v Asii na lokalitách poblíž vodních zdrojů. Do tohoto podrodu náleží například druh *S. inermis*, který je rozšířen ve státech rovníkové Afriky, v Etiopii a Jihoafrické republice. Dále pak druh, který je znám pouze z ostrova Madagaskar – *S. madagascariensis*. Druhy jako *S. squamipleuris* (jako typový druh tohoto podrodu) a *S. hassebi* jsou rozšířené v rovníkové Africe a také v Iráku, Izraeli a Egyptě (Seccombe and kol. 1993). Tyto poslední dva zmiňované druhy spolu s druhy *S. iraqi* a *S. horgani* jsou díky svým morfologickým znakům některými autory řazeny do rodu *Phlebotomus* (Lewis and kol. 1977).

Druhy podrodu *Neophlebotomus* se vyskytují ve východní Asii, centrální Africe a Austrálii v oblastech, kde jsou časté silné deště. Tento podrod je co do počtu druhů největší – 56 druhů, včetně pěti druhů, u nichž není jisté zařazení, jelikož od nich byli nalezeni jen samci či velmi málo exemplářů samic. Do tohoto podrodu náleží například druhy: *S. arboris* (rozšíření: Indie, Srí Lanka), *S. baliva* (roz.: Indonésie), *S. gemmea* (roz.: Thajsko, Malajsie), *S. hoogstraali* (roz.: Austrálie, Papua Nová Guinea, Indonésie), *S. ingrami* (roz.: rovníková Afrika, Etiopie, Súdán, Keňa...), *S. kirki* (roz.: Keňa, Malawi, Súdán), *S. notata* (roz.: Etiopie), *S. serrata* (roz.: Kongo, Etiopie, Keňa, Súdán, Uganda, Zair) a mnoho dalších (shrnutí podle Seccombe and kol. 1993).

Podrod *Parromyia* s typovým rodem *S. africana* se vyskytuje ve většině oblastí Starého světa a v Austrálii. Druhy náležící tomuto podrodu jsou například: *S. magna* ze zemí střední Afriky, Etiopie, Súdánu a dalších zemí, dále pak *S. babu* z Indie, *S. grekovi* z Blízkého východu a bývalého Sovětského svazu (shrnutí podle Seccombe and kol. 1993).

Pouze 4 druhy (*S. arida*, *S. heischii*, *S. iranica* a typový druh *S. lesleyae*) náleží do podrodu *Parvidens*, který je rozšířen v tropické Africe v oblastech Etiopie, Namibie, Keni, Súdánu a Mauretánie (Davidson 1982).

Do podrodu *Sergentomyia* náleží 49 druhů, které je možné rozdělit do tří skupin podle morfologických znaků: (i) skupina *bedfordi*, (ii) skupina *fallax*, (iii) skupina *schwetzi*. *Sergentomyia antennata* je hojně rozšířená například v Etiopii a Keni, nalezneme ji však víceméně v celé Africe, na Blízkém Východě a Arabském poloostrově. *S. bedfordi* se vyskytuje ve střední Africe, často v okolí lidských obydlí. *S. minuta minuta* je rozšířená v mírném klimatickém pásu v Evropě (např. Francie, Itálie, Řecko, Portugalsko, Balkánský poloostrov...) a v oblasti severní Afriky. Důležitým druhem je *S. schwetzi*, který se vyskytuje v severní a střední Africe, často v okolí lidských obydlí. Dalšími druhy z tohoto podrodu jsou například: *S. punjabensis* (Indie, Pákistán, Srí Lanka, Thajsko), *S. arpaklensis* (Uzbekistán, Turkmenistán) (shrnutí podle Seccombe and kol. 1993).

Zástupci podrodu *Sintonius* se vyskytují v suchých biotopech Afriky, Blízkého Východu a Indie. Do tohoto podrodu patří druhy jako například *S. adleri* s výskytem v Africe (např.: Súdán, Egypt, Senegal...) nebo *S. clydei* z oblasti Pákistánu, Kazachstánu, Íránu, Indie, Keni, Etiopie a dalších zemí. Dalším známým druhem je *S. graingeri* z Keni (Ready 2013).

Posledním z devíti podrodů je podrod *Spelaemyia*, rozšířená v subsaharské Africe. Do tohoto podrodu náleží 10 druhů sergentomyií příkladem může být *S. darlingi* z oblastí Mali, Súdánu a Burkiny Faso (Seccombe and kol. 1993).

2.2.2. Flebotomové rodu *Sergentomyia* a přenos patogenů

Proto, aby byl určitý druh flebotoma uznán jako vektor daného patogenu musí splňovat určitá pravidla, která stanovil Killick-Kendrick ve své práci z roku 1990:

1. Potencionální přenašeč musí sát na lidech či zvířatech
2. Přenašeč se musí vyskytovat a sát na lidech či zvířatech v oblasti, kde je přítomen i daný patogen.
3. Z potencionálního přenašeče musí být opakovaně izolován patogen.
4. Stejný druh patogenu musí být izolován jak z přenašeče, tak i z pacientů.
5. Přenašeč umožňuje vývoj patogenu poté, co jej nasál s krví hostitele.
6. Musí být pozorován přenos patogenu na dalšího hostitele sáním potencionálního přenašeče.
7. Přenos patogenu vektorem musí být potvrzen experimentálně například na laboratorním modelu.
8. Pokud se najdou patogeny v neantropofilních vektorech, naznamená to přímo, že nemohou být zapojení do přenosu těchto patogenů, mohou být zodpovědní za přenos v zoonotických ohniscích nemoci.

Killick-Kendrick dále ve své práci zmiňuje, že v odchycených flebotomech záleží také na rozložení leishmaniové infekce v jejich střevě a na její intenzitě (Killick-Kendrick 1990).

Jak již bylo zmíněno dříve, flebotomové rodu *Sergentomyia* upřednostňují pro sání krve studenokrevné obratlovce. Mezi těmito zvířaty přenášejí tzv. plazí leishmanie (podrodu *Sauroleishmania*) dříve řazené do samostatného rodu *Sauroleishmania*, avšak metody molekulární fylogenetiky ukazují, že skupina *Sauroleishmania* je podrodem *Leishmania* (Croan and kol. 1997, Brewster and Barker 1999, Orlando and kol. 2002). Na rozdíl od zástupců rodu *Leishmania* dochází k vývoji ve vektorovi v zadní části střeva, takže je pravděpodobnější přenos leishmaniové nákazy predací hostitele flebotoma a ne při sání krve (Bates 2007). U žádného z dosud známých druhů *Sauroleishmania* nebyl

prokázán přenos na člověka, ale Manson-Bahr a Heisch (1961) se domnívají, že *Le. adleri* izolovaný z ještěrky (*Lastina* sp.) má stejné povrchové antigeny jako savčí leishmanie a mohl by tak infikovat člověka. K tomuto poznatku dospěl potom, co injikoval lidské dobrovolníky intrakutánně tímto izolátem z ještěrky a u infikovaných lidí se v místě vpichu objevila kožní reakce obdobná jako při nákaze lidskou *Le. donovani* (Manson-Bahr and Heisch 1961 citováno podle Belova 1971).

Ve studii z Mongolska zaznamenali vědci leishmaniovou nákazu *S. sinkiangensis* jak v přední tak i v zadní části střeva (Zhang and Leng 1997). V průběhu let bylo v Africe nalezeno více nespecifikovatelných infekcí leishmaniového typu u druhů *S. adleri*, *S. affinis affinis*, *S. africana africana*, *S. antennata*, *S. bedfordi*, *S. clydei*, *S. graingeri*, *S. kirki*, *S. schwetzi* a dalších druhů (Kaddu 1986, Mutinga 1986).

V roce 1984 našli Kaddu a Mutinga pomocí světelné mikroskopie blíže neurčenou promastigotní infekci (usuzují, že se jedná o *Leishmania* sp.) v Malpighických trubicích *S. garnhami* a *S. antennatus*. Odchyty byly provedeny v oblastech Kitui a Machakos v Keni, která jsou ohniskem viscerální leishmaniózy Kala-Azar. Navíc v těchto oblastech vyskytující se *S. garnhami* je přirozeně antropofágní (Kaddu and Mutinga 1984).

Studie ze začátku 80. let 19. století naznačuje, že *S. garnhami* by mohla být sekundárním vektorem *Le. donovani* (primární vektor *P. martini*) v oblastech s epidemickým výskytem Kala-Azar - Machakos, Kitui a Masinga v Keni. Mutinga ve své práci poukazuje především na to, že *S. garnhami* sají jak na plazech, tak i na savcích, což potvrzuje rozbory nasáté krve ve střevech samic, navíc odchyty sergentomyií tohoto druhu byly uvnitř lidských obydlí poměrně úspěšné. Díky těmto výsledkům se Mutinga domnívá, že by mohly samice *S. garnhami* sít i na lidech. V odchycených *S. garnhami* v těchto oblastech byla prokázána infekce promastigoty leishmaniového typu. Infekce blíže nespecifikovanými promastigoty byly prokázány i u dalších druhů sergentomyií z těchto oblastí. Promastigoti izolovaní ze *S. garnhami* byly injikovány do laboratorních myší (Balb/c), u kterých se v případě jednoho z izolátů vytvořila léze podobná lézím při infekci *Le. major*, která způsobuje kutánní formu leishmaniózy. Tento izolovaný kmen leishmanie však nebyl podroben dalšímu zkoumání. Navíc v oblasti Kutui, odkud byl tento izolát, se případy kutánní leishmaniózy nevyskytovaly. Mutinga poukazuje na to, že pokud by byl izolát opravdu *Le. major*, mohla by být *S. garnhami* vektorem *Le. major* a oblast Kutui by byla druhou v Keni, kde by se kutánní forma leishmaniózy vyskytovala (Mutinga

1986). V roce 1994 vyšla studie ze stejné oblasti v Keni, kde Mutinga a jeho kolegové v průběhu let izolovali *Le. major* ze zemních veverek, pískomilů a dalších zvířat, ale také z lidí. Stejně tak byly v této studii odchyceny druhy flebotomů, kteří se potencionálně podílejí v Keni na přenosu *Le. major* v jiných oblastech (*P. duboscqi*, *P. martini*, *S. ingrami* a další). Pomocí radioaktivně značených specifických sond pro kDNA (kinetoplastová DNA) detekovali v DNA z izolátu ze střeva *S. garnhami* *Le. major*. Při mikroskopickém pozorování *S. garnhami* byly leishmaniové infekce lokalizovány v přední části střeva, což je nezbytné pro přenos leishmanií sáním na hostitele. Tyto výsledky a to, že *S. garnhami* sají mimo divokých zvířat, která mohou sloužit jako rezervoár pro infekci *Le. major*, také na lidech v této oblasti, silně naznačuje, že *S. garnhami* je v oblasti Kutui vektorem kutánní leishmaniózy v antropozoonotickém cyklu. Avšak v laboratorních podmínkách nebyla *S. garnhami* jako vektor potvrzena (Mutinga and kol. 1994a).

V západní části Keni v Baringo oblasti jsou potvrzeny nákazy *Le. donovani* a *Le. major*. Potvrzeným vektorem pro přilehlé části dalších států je *P. duboscqi*, avšak v oblasti Baringo nebyl vektor leishmanie způsobující kutánní nákazu dlouho potvrzen. Ve studii z roku 1986 Mutinga a jeho kolegové uskutečnili odchvy flebotomů v této oblasti. Z těchto flebotomů kultivovali nalezené promastigotní infekce a izoláty injikovaly laboratorní myši. Jako možnými primárními vektory *Le. major* v této oblasti stanovili *P. duboscqi*. Jako sekundárního vektora pro sylvatický cyklus určili *S. ingrami*. *Leishmania major* byla potvrzena i v izolátech ze *S. adleri* a *S. antennatus*. Vektorem *Le. donovani* v této oblasti je *P. martini* (Mutinga and kol. 1986, Schaefer and Kurtzhals 1994). V roce 2011 v Senegalu provedli korelační studii, kdy porovnávali množství jednotlivých druhů flebotomů se séroprevalencí proti *L. infantum* u psů. Odchyty v této studii byly prováděny v ohnisku *Le. infantum* (psí leishmaniózy), kdy byly majoritními druhy *S. schwetzi*, *S. dubia* a *S. magna*. Výsledky z těchto odchytů byly analyzovány s výsledky z předchozích sérologických vyšetření psů na *Le. infantum*, z čehož usoudili, že nejvíce zastoupený druh (*S. schwetzi*) v oblasti s vysokou séroprevalencí psů proti *Leishmania* sp. by se mohl podílet na přenosu psí leishmaniózy (Senghor and kol. 2011).

V Íránu byla pomocí specifické amplifikace z celkové DNA flebotoma detekována přítomnost DNA *Le. major* a *Le. gerbilli*. Flebotomové byly odchyceny v lokalitě Isfahan, kde se nachází přírodní ohnisko kutánní leishmaniózy. Pro amplifikaci pomocí nested PCR

byly použity primery pro ITS-rDNA *Le. major*. DNA této leishmanie byla prokázána v *S. sintoni* (Parvizi and Amirkhani 2008).

V minulém roce (2012) vyšla práce Berdjane-Brouk a kolegů, která se věnuje problematice přenosu kutánní leishmaniózy v Mali. V této studii opět využili PCR specifickou amplifikaci ITS2 genů *Le. major* ve vzorcích totální DNA z odchycených flebotomů v oblasti Bandiagara. Nejvíce zastoupeným druhem flebotoma se ukázala být *S. darlingi*, ze které v jednom vzorku byla v této studii prokázána i lidská DNA. Ve stejném vzorku byla také prokázána DNA *Le. major*. Druhým detekovaným druhem flebotoma byl *P. duboscqi*, který je prokázaným vektorem *Le. major* v dalších zemích saharské Afriky. Z těchto výsledků lze usuzovat, že *S. darlingi* by mohla hrát roli v přenosu kutánní leishmaniózy v Mali (Berdjane-Brouk and kol. 2012).

V dvou nejnovějších studiích byla také využita PCR specifická amplifikace genů leishmanií. První práce se věnuje leishmanióze v Thajsku, způsobené *Le. siamensis*. V této oblasti má největší zastoupení rod *Sergentomyia*, konkrétně druh *S. gemmea*. Z rodu *Phlebotomus* byl v průběhu sběru vzorků odchycen jen jeden zástupce a to *P. stantoni*. Pomocí PCR amplifikace hsp70 *Le. siamensis* byla prokázána přítomnost DNA této leishmanie v *S. gemmea* (Kanjnopas and kol. 2013). Druhá práce z roku 2013 seznamuje s první detekcí DNA *Le. major* v *S. minuta* z rurální oblasti Algarve v Portugalsku a celkově v celé Evropě (Campino and kol. 2013).

Mimo savčí a plazi leishmanie byly u flebotomů rodu *Sergentomyia* prokázány infekce trypanosom z plazů. Jedním z příkladů je *Trypanosoma platydactyli* přenášená *S. minuta*. Dále například trypanosoma parazitující v žábách (*Bufo bufo gargarizans*) v Číně, kde je jejím vektorem *S. squamirostris*. V průběhu let bylo zaznamenáno mnoho blíže neurčených infekcí trypanosomového typu v sergentomyiích (Adler and Theodor 1957).

V neposlední řadě jsou sergentomyie zapojeny i do přenosu lidských virových onemocnění. Příkladem může být nález Chandipura viru ve flebotomech rodu *Sergentomyia* v Senegalu, či izolace tohoto viru z *S. bailyi* a *S. punjabensis* (Fontenille and kol. 1994, Geevarghese and kol. 2005). V odchycených flebotomech *S. minuta* v jižní Francii byla identifikována RNA Toscana viru (Charrel and kol. 2006). V pokusu z roku 2000 se Dohmovi a kolegům podařilo laboratorně nakazit *S. schwetzi*, *P. papatasi*, *P. duboscqi*, *P. sergenti* Rift Valley virem (RFV) sáním na nakažených morčatech (Dohm and kol. 2000).

2.3. Leishmanióza

Leishmanióza je onemocnění způsobené jednobuněčným parazitem rodu *Leishmania* (Excavata, Euglenozoa, Kinetoplastida, Trypanosomatida), který parazituje uvnitř fagocytyjících buněk lidí a zvířat. Z rodu *Leishmania* bylo 21 druhů identifikováno jako patogenních pro lidi (Singh 2006). Klinické projevy tohoto onemocnění jsou poměrně nesourodé, od drobných kožních projevů, přes znetvoření obličeje až po napadení vnitřních orgánů. Podle těchto projevů je možné rozdělit jednotlivé druhy leishmanií do skupin, podle toho jak vážné problémy hostiteli působí. Do první skupiny náleží druhy leishmanií, které způsobují kožní (kutánní) formu leishmaniózy (KL). Druhá skupina leishmanií způsobuje kožně-slizniční formu leishmaniózy (MKL) a třetí skupina způsobuje viscerální, neboli orgánovou formu leishmaniózy (VL) (shrnutí podle Davidson 2005). O klinickém projevu leishmaniózy rozhoduje mimo kmene leishmanie i další faktory jako je například aktuální imunitní stav člověka, jeho genetické predispozice a mnoho dalších faktorů (Antinori and kol. 2012).

Tabulka 1: Rozdělení leishmanióz (upraveno podle Davidson 2005)

Klinické projevy	Druh leishmanie	Přibližné rozšíření
Kožní forma leishmaniózy (KL)	<i>Le. tropica</i> , <i>Le. major</i> , <i>Le. aethiopica</i> , <i>Le. mexicana</i>	Afghánistán, oblast Mediteránu, Střední Východ, severní a západní Afrika, Střední Amerika, oblast Amazonie, Keňa, Etiopie
Kožně slizniční forma leishmaniózy (MKL)	<i>Le. braziliensis complex</i>	Brazílie, Ekvádor, Kolumbie, Peru, Venezuela
Viscerální forma leishmaniózy (VL)	<i>Le. donovani</i> , <i>Le. infantum (Le. chagasi)</i>	Argentina, Brazílie, Etiopie, Čína, Indie, Írán, Keňa, Kolumbie, Súdán, oblast Mediteránu, Venezuela

Každý rok je zaznamenáno průměrně 200 000 až 400 000 případů VL a 700 000 až 1 200 000 případů KL, přičemž více jak 90 % z celosvětových případů VL je v šesti zemích - Indie, Bangladéš, Súdán, Jižní Súdán, Etiopie a Brazílie. Nejvíce případů kutánní leishmaniózy je v Afghánistánu, Alžírsku, Kolumbii, Brazílii, Íránu, Sýrii, Etiopii, Severním Súdánu, Kostarice a Peru. Vysoké procento případů KL je také v oblasti Mediteránu. Ročně zemře na leishmaniózu 20 až 40 tisíc lidí (Alvar and kol. 2012).

Jak již bylo mnohokrát řečeno v této práci, za přenos leishmanií mezi jejich hostiteli jsou zodpovědní flebotomové, v Novém světě rod *Lutzomyia* a ve Starém světě rod *Phlebotomus* a *Sergentomyia* (Ready 2013).

Životní cyklus leishmanií zahrnuje dvě základní morfologické buněčné formy. První morfologická forma, která je injikována do obratlovčího hostitele při sání flebotoma, se nazývá promastigot, jehož buňka je protáhlá a má dlouhý bičík. Tito promastigoti po vstupu do kůže infikují kožní makrofágy, ve kterých přežívají intracelulárně ve fagolysosomech a mění se na druhou morfologickou formu - amastigoty. Amastigoti mají buňku kulovitou a mají velmi krátký bičík nepřesahující ústí periflagelární kapsy. Amastigotní stádia se v makrofázích množí a po uvolnění z makrofágů jsou schopni infikovat další makrofágy a monocyty. Nákaza je rozšiřována dále do těla lymfatickým a cévním systémem. Pokud jsou amastigoti nasátí s krví vektorem, začnou se v jeho střevě měnit na takzvané procyklické promastigotní stádia. Tyto stádia přecházejí ve vektorovi trávení krve, kdy zaniká peritrofická matrix, a defekaci nestrávených složek nasáté krve. Poté začnou migrovat směrem do přední části trávicího traktu k stromodeální valvě, kde se začnou množit na metacycklické promastigoty, kteří jsou schopni při sání flebotoma opět infikovat obratlovčího hostitele (shrnutí podle Singh 2006).

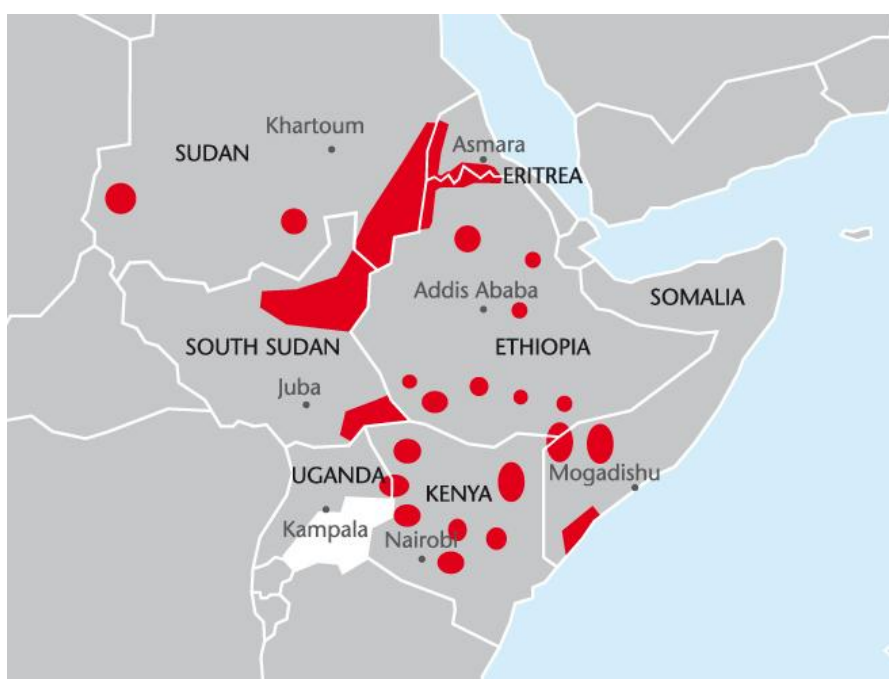
Flebotomové jako vektorů leishmanií mohou být rozděleni do dvou skupin, podle toho jestli jsou schopni přenášet jen jeden určitý druh leishmanie nebo více druhů. V prvním případě hovoříme o specifických vektorech, v druhém případě o vektorech permisivních (Volf and kol. 2008).

2.3.1. Viscerální leishmanióza v oblasti východní Afriky se zaměřením na Etiopii

Viscerální leishmaniózu způsobuje komplex druhů *Le. donovani*. Ohniska onemocnění ve východní Africe a v Indii způsobuje *Le. donovani* sensu stricto, zatímco v oblasti Evropy, Severní a Latinské Ameriky, Blízkého Východu, Střední Asie, Číně je za toto onemocnění zodpovědná *Le. infantum* (syn. *Le. chagasi*). Po uplynutí inkubační doby (2-6 měsíců) se začnou projevovat klinické příznaky dlouhodobé systémové infekce – horečky, slabost, ztráta chuti k jídlu a váhy, hyperpigmentace kůže (odtud název Kala-Azar, černá nemoc) lymfadenopatie a hepatosplenomegalie (shrnutí podle Chappuis and kol. 2007).

V přenosu leishmanióz mohou hrát důležitou roli zvířata, která mohou sloužit jako rezervoár infekce. Pokud infekce koluje pomocí vektora mezi zvířaty a lidmi, hovoříme o tzv. antropozoonóze. Tento typ přenosu je charakteristický pro *Le. infantum*, kdy jsou rezervoárem psovitě šelmy včetně domácích psů (Alvar and kol. 2004). Opakem antropozoonózy je antroponóza, kdy dochází k přenosu patogena mezi lidmi (př.: *Le. donovani* v Indii) (Bhattarai and kol. 2010).

V oblasti východní Afriky je situace VL nejkritičtější v Etiopii, Keni, Somálsku, Súdánu a Ugandě (Obrázek 1).



Obrázek 1: Ohniska VL v oblasti východní Afriky: situace v roce 2011
(upraveno podle <http://endtheneglect.org>)

V Keni jsou ohniska VL v provincii Rift Valley (např. oblast Baringo), v centrální a jižní části Východní provincie (např. oblasti Machakos, Kitui a Masinga) a od roku 2001 také v Severovýchodní provincii (např. oblasti Wajir a Mandera) (shrnutí podle Tonui 2006). Potvrzeným vektorem *Le. donovani* v Keni je *P. martini* a pravděpodobným vektorem v oblasti Isiolo, kde se *P. martini* nevyskytuje, bude *P. orientalis* (Ngumbi and kol. 2010). Geografická oblast Rift Valley zasahuje až za hranice Keni do Ugandy, kde je v této části (Pokot district) také ohnisko VL (Kolaczinski and kol. 2007).

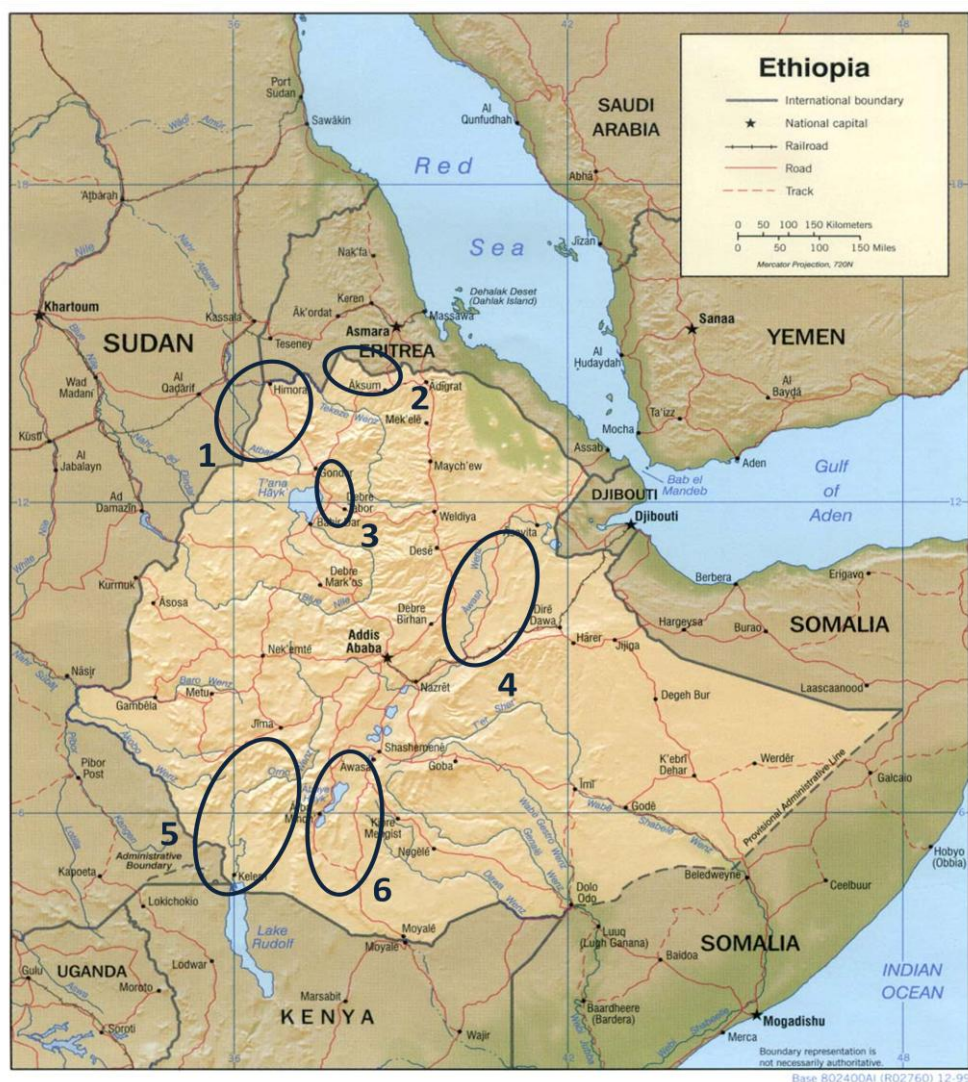
V Somálsku jsou epidemie VL hlášené z okolí řeky Shebelle na jihu Somálska, regionu Dolní Juba a oblasti Baidoa v regionu Bay. Ovšem situace mapování nových ohnisek

a lékařské pomoci v již endemických ohniscích je v Somálsku složitá, především z důvodu dlouhotrvajících politických a vojenských konfliktů. Cyklus *Le. donovani* v této oblasti bude pravděpodobně antroponotický, kdy stejně jako v Keni, bude hlavním vektorem *P. martini* (shrnutí podle Ngure and kol. 2009).

V Súdánu je nejproblémovější oblastí s výskytem VL jihovýchod země – podél toku Bílého Nilu, okolí pohoří Nuba a ve státě Darfur. Tato oblast se táhne podél hranice s Etiopií až do Jižního Súdánu – do oblasti Horního Nilu. V Jižním Súdánu se nachází další region s endemickým výskytem VL u hranic s Keňou (oblast Kapoita). Potvrzeným vektorem *Le. donovani* v této oblasti je *P. orientalis* (shrnutí podle Seaman and kol. 1996, Ngure and kol. 2009).

Problematika viscerální leishmaniózy v Etiopii

V Etiopii se každoročně objeví 200 až 4500 nových případů VL. První případ VL v Etiopii zaznamenali roku 1942 (WHO 2013). VL v této oblasti nejčastěji postihuje děti a mladé lidi do 23 let. Od roku 1970 počet případů VL narůstá, nejspíše díky programu pro rozvoj zemědělství, který má jako vedlejší efekt migraci obyvatelstva v regionu Tigray na severu země (oblast Humera) (Berhe and kol. 2001). Navíc v Etiopii (regiony Tigray a Amhara) byla zaznamenána pozitivní korelace mezi lidmi nakaženými VL a HIV. V případě této koinfekce je riziko úmrtí až 4× vyšší než u pacientů s VL bez nákazy HIV (Alvar and kol. 2008).



Obrázek 2: Mapa Etiopie s označenými ohnisky VL (situace v roce 2012):
1 oblasti Humera a Metema, 2 oblast vysočiny Libo Kemkem, 3 oblast Sheraro, 4 oblast doliny Awash, 5 oblast nížin v okolí řeky Omo, 6 oblast nížiny Aba Roba (upraveno podle <http://commons.wikimedia.org>)

V Etiopii je šest hlavních endemických oblastí s výskytem VL. První se nachází na severozápadě země, u hranic se Súdánem v regionech Tigray a Amhara – oblasti Humera a Metema (Obrázek 2: oblast 1). Odtud se nejspíše VL rozšířila i do druhé oblasti, do regionu Amhara – vysočiny Libo Kemkem na severozápadě Etiopie (Obrázek 2, oblast 2). Před rokem 2005 se zde VL nevyskytovala, ale za posledních 5 let výrazně přibýlo nových případů VL (Bashaye and kol. 2009, Herrero and kol. 2009). Třetí lokalita, Sheraro (region Tigray) (Obrázek 2, oblast 3), je nejspíše novou endemickou oblastí pro výskyt VL od roku 2010 (WHO 2013). Čtvrtá lokalita je dalším pravděpodobně novým ohniskem VL a nachází se ve střední Etiopii (Obrázek 2, oblast 4). Jedná se o lokalitu v okolí doliny Awash (Melka Werer, región Afar) (Herrero and kol. 2009). Pátá a šestá lokalita je v jižní a jihozápadní části Etiopie – nížiny v okolí řeky Omo (Obrázek 2, oblast 5) a nížiny Aba Roba (Obrázek 2, oblast 6) (Fuller and kol. 1979, Ali and Ashford 1994).

V jižní Etiopii jsou potvrzenými vektory *Le. donovani*, *P. celiae* a *P. martini*, v jihozápadní části země druh *P. orientalis* (Hailu and kol. 1995, Gebre-Michael and Lane 1996). V ohniscích VL na severozápadě Etiopie nebyl vektor *Le. donovani* ještě potvrzen, ale pravděpodobně bude za její přenos zodpovědný *P. orientalis*, stejně jako tomu je i v sousedním Súdánu, i když v této části Etiopie stále nebyl odchycen exemplář infikovaný *Le. donovani* (Elnaiem and kol. 2001, Gebre-Michael and kol. 2007, 2010, Elnaiem 2011). Dalšími zástupci rodu *Phlebotomus* vyskytujícími se na území Etiopie jsou například: *P. alexandri*, *P. arabicus*, *P. bergeroti*, *P. duboscqi*, *P. longipes*, *P. papatasi*, *P. rodhaini*, *P. saveus*, *P. sergenti*. Z rodu *Sergentomyia* se zde vyskytují druhy: *S. adleri*, *S. africana*, *S. antennata*, *S. bedfordi*, *S. clydei*, *S. squamipleuris* a *S. schwetzi* (Fuller and kol. 1979, Ngumbi and kol. 1992, Hailu and kol. 1995, Gebre-Michael and kol. 2004, 2007, 2010). V *S. schwetzi* byla v oblasti jihozápadní Etiopie nalezená blíže neurčená promastigotní infekce v přední části střeva (Hailu and kol. 1995).

Jak již bylo řečeno výše, VL může mít charakter antropozoonózy či zoonózy. V oblasti východní Afriky se uplatňují oba tyto typy koloběhů nákazy v přírodě. V průběhu epidemií má VL pravděpodobně charakter antropozoonózy, kdy dochází k šíření patogenu z člověka na člověka prostřednictvím vektora (Ashford 1996). Pokud epidemie v dané lokalitě opadnou, nastává nejspíše přesun koloběhu VL v oblasti do přírodních ohnisek. Ve východní Africe však zatím nebyl potvrzený žádný rezervoárový hostitel (Elnaiem 2011).

2.3.2. Viscerální leishmanióza v oblasti Rumunska

Viscerální leishmanióza v Rumunsku je způsobená *Le. infantum*. Cirkulace nákazy v prostředí má charakter antropozoonózy, kdy je prokázaným rezervoárem pes domácí. Potvrzenými vektory *Le. infantum* v této oblasti jsou druhy flebotomů *P. neglectus* a *P. perfiliewi* (oba podčeleď *Larroussius*) (WHO 2013).

První případ VL v Rumunsku byl zaznamenán v roce 1912. Mezi roky 1953 a 1954, propukla epidemie VL v regionu Oltenia na jihozápadě Rumunska, kdy zemřelo 24 lidí, z toho 23 dětí. Flebotomové se zde oblasti vyskytují spíše v oblastech přírodních bez lidských sídel, tudíž k přenosu na člověka dochází především při narušení přírodního ekosystému. Od konce této epidemie, až do roku 1989 nebyl v Rumunsku zaznamenán žádný případ VL (Zahar 1979, Neghina and kol. 2011, WHO 2013). Mezi roky 1968 a 1970 se uskutečnil monitoring flebotomí fauny v Rumunsku, v oblasti Dobroudgea a Dodoja (jihozápad země - Banát), při kterém byly identifikovány druhy: *P. sergenti*, *P. major*, *P. chinensis balcanicus*, *P. perfiliewi*, *P. longiductus* a *S. minuta*. Flebotomové druhu *P. perfiliewi*, kteří byli identifikováni, jako pravděpodobný vektor *Le. infantum* v oblasti Rumunska, byli odchyceni nejčastěji v okolí nor hlodavců a hnízd ptáků, avšak malé množství exemplářů bylo nalezeno i v lidských obydlích (Duport and kol. 1971 citováno podle Zahar 1979). Na jihovýchodě země v oblasti Dunajské Deltě byl prováděn odchyt flebotomů mezi roky 1960 a 1967, při kterém byly zaznamenány druhy *P. papatasi*, *P. major*, *P. chinensis balcanicus* a *P. longiductus*. V této oblasti nebyly případy nákazy lidí VL zaznamenány, ale psí leishmanióza zde byla pozorována (Zahar 1979).

V posledních šesti letech se zdají být největším rizikem importované nákazy VL z ostatních států Evropy, kam často Rumuni dojíždějí za prací. Pomocí retrospektivní analýzy byly v roce 2005 zaznamenány tři případy importované VL ze Španělska a další dva případy z let 1999 a 2004 byly importovány z Řecka (Neghina and kol. 2009, Găman and kol. 2010).

3. Materiál a metodika

3.1. Chov flebotomů

Naše laboratoř (Laboratoř hmyzích vektorů, Katedra parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze) se mimo jiné specializuje na chov flebotomů. V současné době máme k dispozici 10 různých druhů, přičemž od několika z nich laboratoř vlastní i kolonie s různým místem původu. Kolonie jsou vedeny standardním způsobem (Volf and Volfova 2011) v místnostech, kde se udržuje stálá teplota a vlhkost vzduchu (25 – 26 °C, 60 – 70% vlhkost).

Dospělci jsou chováni v monofilové síti natažené na kovové konstrukci ve tvaru krychle (40×40×40 cm), kde dostávají jako potravu vatu namočenou v 50% roztoku cukru. Jednou týdně se vkládá do sítě uspaná myš (anestezie viz použité roztoky), či neuspaný imobilizovaný králík, na nichž samice sají krev, která obsahuje potřebné proteiny pro dokončení gonotrofických cyklů. Krví nasáté samice jsou za pomoci tzv. exhaustoru zpravidla přeneseny do malé monofilové sítě (kovová konstrukce velikosti 20×20×20 cm) a umístěny v inkubátoru se stabilní teplotou a vlhkostí (26 °C, 60% vlhkost). Po 5 – 7 dnech jsou nasáté samice po defekaci krve přemístěny do plastových kelímků vymazaných sádrou, do kterých během následujícího týdne nakladou vajíčka. Kelímky jsou uskladněny v inkubátoru ve větších plastových dózách vysypaných vlhkým pískem pro udržení správné vlhkosti. Z vajíček se během dalších čtyř až pěti týdnů postupně vyvíjí čtyři larvální stádia a kukly, z nichž začnou vyletovat dospělí flebotomové. Larvy jsou po dobu larválního vývoje krmeny směsí fermentovaných králíčních bobků a pelet pro králíky.

V této diplomové práci bylo pracováno s několika koloniemi flebotomů. Většina pokusů byla prováděna na kolonii druhu *S. schwetzi* (Etiopie, 2010). Další použité druhy flebotomů byly *P. duboscqi* (Senegal, 2008), *P. orientalis* (Etiopie, oblast Melka Werer, 2010), *P. papatasi* (Turecko, 2005), *P. perniciosus* (Španělsko, 2007) a *L. longipalpis* (Brazílie, 1991).

Použité roztoky:

- Anestezie: 2% xylazin (Rometar, Bioveta a.s., kat. č. 394), 10% ketamin (Narketan, Vetoquinol, kat. č. 06106), sterilní fyziologický roztok (150 mM NaCl), intraperitoneální dávkování, dle váhy – 150 mg/kg xylazinu a 15 mg/kg ketaminu.

3.2. Pitva slinných žláz

Ve většině pokusů bylo pracováno se slinnými žlázami samic flebotoma *S. schwetzi*. Mimoto byly použity žlázy dalších druhů flebotomů – *P. duboscqi*, *P. orientalis*, *P. papatasi*, *P. perniciosus*, *L. longipalpis*. Pro účely získání antigenu pro metodu ELISA byly pitvány samice Starší tři a více dní, které by měly mít obsah proteinů slinných žláz již kompletní (Volf *and kol.* 2000). Před vyjmutím slinných žláz byly flebotomové uspáni v kelímku na ledu. Samotné vyjmutí žláz se provádí pod binokulární lupou za pomoci tzv. pitvátek (dřevěná špejle, do které je napíchnutá entomologická minucie velikosti N° 0,2) a ostré pinzety (Sigma-Aldrich, kat. č. T4287-1EA).

Samicím byly nejprve odděleny končetiny a křídla. Zbytek těla byl převeden do kapky Tris-NaCl pufru na odmaštěném podložním sklíčku, následně byla pomocí pitvátek oddělena hlava. Slinné žlázy uvolněné z těla a připojené za hlavou byly pitvátkem přeneseny do mikrozkušavky s Tris-NaCl puforem a uskladněny v -20 °C jako budoucí antigen pro ELISA metodu. Pro uskladnění byla vždy dodržována koncentrace jedna žláza na 1 µl pufru.

Použité roztoky:

- Tris-NaCl pufr: 20 mM Trizma® (Sigma-Aldrich, kat. č. T1503); 150 mM NaCl; pH 7,6

3.3. Odběr zvířecích sér a krve

3.3.1. Odběr sér domácích zvířat v Etiopii

Pro potřeby této diplomové práce byla použita krevní séra domácích zvířat ze severní a severozápadní Etiopie. První část odběrů byla prováděna v oblasti Addis Zemen a Sheraro na začátku října 2010. Druhá část vzorků byla odebrána v lokalitě Humera na konci listopadu 2010. Všechny odběry krve byly prováděny se souhlasem majitele, pod dohledem veterinářů a ve spolupráci s MVDr. Gadem Banethem¹, Ph.D. a Prof. Asratem Hailu², Ph.D.

Celkově bylo odebráno 603 vzorků od pěti druhů domácích zvířat (*Tabulka 2*). Jednotlivé vzorky byly zaevidovány pod jedinečným číslem, ke kterému byly doplněny další informace o zvířeti: druh, pohlaví, přibližné stáří, jméno vlastníka farmy a její GPS souřadnice a dále pak případné klinické projevy onemocnění.

Zvířatům se celkově odebíralo přibližně 5 ml krve pomocí jednorázových injekčních jehel (21G) z vena saphena u psů a z vena jugularis u ostatních druhů zvířat. Část krve byla převedena do skleněné zkumavky pro serologické vyšetření.

Z krve určené pro serologické vyšetření bylo po jejím sražení odebráno sérum do mikrozkušavek, do kterých bylo přidáno 25 µl 1% roztoku azidu sodného. Takto ošetřené sérum bylo v Etiopii skladováno při -20 °C. Po převozu do České republiky byla séra uchovávána v teplotě -70 °C. Pro účely pokusů byly udělány aliquoty po 150 µl, které byly uchovány při -20 °C.

Jako kontroly pro serologická vyšetření byla použita séra odebraná zvířatům v České republice (vyjma psů). Ve spolupráci s doc. MVDr. Davidem Modrým³, Ph.D. a MVDr. Kamilem Sedlákem⁴, Ph.D. bylo celkem získáno 82 kontrolních sér (*Tabulka 2*). Jako kontrolní vzorky posloužila psí séra z laboratorního chovu v Německu a séra psů z Itálie

¹ Koret School of Veterinary Medicine, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food & Environment, The Hebrew University of Jerusalem

² Faculty of Medicine, Addis Ababa University in Ethiopia

³ Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

⁴ Laboratoř virologie a sérologie, Státní veterinární ústav Praha, Česká republika

(*Tabulka 3*). Tyto vzorky byly použity též ve studii Vlkova and kol. 2011, v níž je podrobně popsána metodika imunizace psů a stanovení positivity na *Le. infantum*.

Tabulka 2: Přehled testovaných a kontrolních sér

Lokalita Zvíře	Addis Zemen	Sheraro	Humera	Etiopie celkem	Kontroly ČR
Skot	66	26	16	108	33
Ovce	30	7	144	181	32
Koza	–	114	139	253	23
Osel	3	14	7	24	8 osel 9 kůň
Pes	22	7	8	37	–
Celkem	121	168	314	603	82

Tabulka 3: Kontrolní psí séra

Psí séra ze studie Vlkova and kol. 2011	Původ sér	Počet použitých sér celkem
Neimunizovaní psi	Německo – laboratorní chov	33
Imunizovaní sáním <i>P. perniciosus</i>		5
Imunizovaní sáním <i>L. longipalpis</i>		5
Psi pozitivní na <i>Le. infantum</i>	Itálie	4
Psi negativní na <i>Le. infantum</i>		3

3.3.2. Odběr krve a séra psů v Rumunsku

Dalšími testovanými vzorky byla séra a DNA izolovaná z krve psů z Rumunska. Celkově byly odebrány vzorky ze 412 psů různých plemen. Odběry probíhaly od října roku 2009 do října roku 2012 ve čtyřech různých částech Rumunska (*Tabulka 4*). Krev byla psům odebírána z vena cephalica. Pro následnou izolaci DNA byly na odběr použity zkumavky s EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) či s etanolem. Poté byly vzorky zamrazeny. Samotná izolace byla prováděná fenol–chloroformovou extrakcí. Pro serologická vyšetření byly na odběr krve použity skleněné zkumavky, ve kterých byla krev centrifugována pro oddělení séra. Sérum bylo ošetřeno azidem sodným a zamrazeno. Každému odebranému zvířeti bylo přiřazeno evidenční číslo, ke kterému byly doplněny datum a místo odběru, pohlaví psa, přibližný věk, adresa a kontakt na majitele, plemeno psa, případné klinické projevy onemocnění.

Vzorky byly odebrány a zpracovány kolegy z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně pod vedením doc. Davida Modrého po souhlasu majitelů psů. S docentem Modrým spolupracoval kolega Andrei D. Mihalca⁵, Ph. D. a Kálmán Imre⁶, Ph. D.

Tabulka 4: Odebraná séra a vyizolovaná DNA psů z Rumunska

Lokalita	Počet odebraných vzorků DNA	Počet odebraných vzorků sér
Cluj	10	–
Delta	166	47
Transylvánie	16	4
Banát	–	187
Bez bližších informací o vzorku	22	–
Celkem	214	238

3.3.3. Odběr sér laboratorních myší

Pro některé pokusy jsme použili séra získaná z myší kmene Balb/c z laboratorního chovu v naší laboratoři. Každá myš byla dlouhodobě imunizovaná opakovaným sáním jednoho určitého druhu flebotoma. Odběr krve se prováděl buď ze špičky ocasu (přibližně 0,1 ml krve) či kompletním vykrvením (přibližně 1,5 ml krve). Všechny manipulace s myšmi byly prováděny na katedře parazitologie PŘF UK pod dozorem osoby vlastnící Certifikát pro práci se zvířaty dle § 17 zákona č. 246/1992 sb. (Dr. Kolářová, č.: CZU934/05).

Po odstřížení špičky ocasu, byla vytlačována krev po kapkách do připravených skleněných heparinizovaných kapilár (objem 60 µl, Dialab, kat. č. 141162). Po naplnění kapiláry krví do třech čtvrtin délky byl čistý konec zataven nad kahanem. Kapiláry byly (z každé myši maximálně dvě) centrifugovány (MPW 310) 5 minut na 3830 RCF. Po oddělení plasmy od krvinek byly kapiláry diamantovou tužkou přeříznuty na rozhraní fází a plasma pomocí balónku vytlačena do mikrozkuřavky.

Pokud byl nutný větší objem séra, byla myš kompletně vykrvena. Po intraperitoneálním podání 9 až 11 dílků (22,5 – 27,5 µl) anestezie (složení viz kapitola 3.1)

⁵ Department of Parasitology and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca

⁶ Department of Food Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Banat University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Timisoara

pomocí jednorázové injekční jehly byl navozen hluboký spánek, při němž myš nereagovala na algické podněty. Pomocí pitvacích nůžek a pinzety byla myši nastříhnuta kůže na hrudi v oblasti cartilago xiphoidea, odkud se pokračovalo kraniálně podél sterna až ke klavikule. Dále se kůže nastříhla laterálně od cartilago xiphoidea do vzdálenosti přibližně půl centimetru. Tímto se vytvořila z kůže „kapsa“, ze které se odsávala krev z přestřižené aorta dorsalis do předem připravených mikrozkuvek. Poté byla myš usmrcena stržením vazů. Odebraná krev v mikrozkuvkách byla centrifugována 5 minut při 3911 RCF (Hettich Universal 320R). Oddělené sérum bylo převedeno do čistých mikrozkuvek a zamraženo.

Séra a plasma byla uchovávána při teplotě -20 °C.

3.4. Leishmanie

Pokusy pro tuto diplomovou práci byly prováděny s *Le. infantum* (MCAN/PT/2005/IMT 373, izolát ze psa, dr. Carla Maia⁷, Portugalsko, 2009), které jsou uloženy v kryobance v mrazuvzdorných mikrozkuvkách v médiu, které obsahuje 5 – 10 % dimethylsufoxid (Sigma-Aldrich, kat. č. D5879).

Pro potřeby pokusů jsou leishmanie očkovány do kultivačních zkuvek (Schoeller, kat. č. 156758) s médiem, které jsou uchovávány v termostatu se stabilní teplotou 23 °C a podle rychlosti růstu jsou za pět až sedm dní přeočkovány do nové kultivační zkuvky s čerstvým médiem.

Při použití leishmanií v pokusech je nutné odmyt z kultury médium a spočítat koncentraci buněk v roztoku. Původní kultura je centrifugována (Hettich Universal 320R, 2580 RCF, 8 min, 23 °C) a pelet resuspendován v semisterilním fyziologickém roztoku a opět stočen. Tento krok se dvakrát opakuje. Poté se sediment resuspenduje do 1 ml fyziologického roztoku, ze kterého je odebráno 10 µl, ty jsou přidány k 990 µl ředícího roztoku, který obsahuje 1% formaldehyd, díky němuž dojde k usmrcení leishmanií. V Bürkerově komůrce (P-lab) pod mikroskopem je spočítána koncentrace tohoto roztoku. Zásobní roztok s leishmaniemi je uskladněn v -80 °C.

⁷ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

Použité roztoky:

- Médium pro *Le. infantum*: Médium 199 (Sigma-Aldrich, kat. č. M7528), 30 % fetální kravské sérum (Gibco, kat. č. F9665), 2 % sterilní moč, 1 % roztoku BME vitamínů (Sigma-Aldrich, kat. č. B6891), 0,01 % amikinu (Bristol-Myers Squibb, kat. č. 2H3236)
- Ředící roztok: 0,85 % NaCl, 1 % formaldehyd

3.5. ELISA

Pro zjištění přítomnosti protilátek u domácích zvířat proti slinám *S. schwetzi* a *Le. infantum* byla využita metoda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Dále byla tato metoda využita pro zjištění zkřížených antigenních reakcí mezi flebotomy *S. schwetzi*, *P. orientalis*, *P. papatasi*, *P. duboscqi*, *P. perniciosus* a *L. longipalpis*.

3.5.1. Stanovení protilátek proti slinám flebotomů

Opakovaným zmrazením v tekutém dusíku a rozmrazením v teplé vodě byly slinné žlázy *S. schwetzi* a dalších druhů flebotomů zhomogenizovány a poté převedeny do navazovacího roztoku (karbonát-bikarbonát, pH 9,0). Takto připravený antigen byl rovnoměrně rozdělen do mikrotitrační destičky (Nunc® CovaLink™, Thermo Scientific) po 100 µl na jamku. Koncentrace odpovídala jedné pětině žlázy na jednu jamku pro všechny již zmíněné druhy flebotomů vyjma *L. longipalpis*, kdy pro dosažení dané koncentrace, byly nutné dvě pětiny žlázy na jednu jamku. Takto připravená destička byla inkubovaná přes noc ve 4 °C. Druhý den se jamky 2× promyly promývacím roztokem (PBS-Tween, pH 7,2) a povrch jamek byl blokován příslušným blokovacím 6% ředícím roztokem ředěným do PBS-Tween (*Tabulka 5*). Takto připravená destička byla inkubovaná 60 minut ve 37 °C.

Před nanesením sér byly jamky 3× promyty PBS-Tween. Testovaná séra byla nanášena na destičku po 100 µl v dubletech a zředěná v příslušném 2% ředícím roztoku (*Tabulka 5*). Po 90 minutách inkubace ve 37 °C byla destička 6× promyta PBS-Tween a do jamek byl po 100 µl nanesen konjugát (sekundární protilátka s navázanou peroxidázou). Inkubace trvala 45 minut při 37°C. V posledním kroku po promytí (6× PBS-Tween) byl na destičku přidán substrátový roztok (McIlweein fosfát-citrát, pH 5,5) s peroxidem vodíku

(H₂O₂) a OPD (ortho-fenylendiamin). V průběhu vyvolávání byla destička zakrytá hliníkovou fólií a po šesti až deseti minutách bylo do každé jamky přidáno 100 µl 10% kyseliny sírové (H₂SO₄) pro zastavení reakce. Při vyvolávání došlo ke změně barvy roztoku v jamkách. Míra zabarvení by měla být přímo úměrná množství protilátek v daném séru navázaných na antigen. Absorbance byla měřena při vlnové délce 492 nm za použití spektrofotometru Tecan Infinite M200. Ředění sér, konjugátů a použité ředící roztoky pro jednotlivé pokusy jsou shrnuty v *Tabulka 5*. *Tabulka 6* pak uvádí výrobce a katalogová čísla použitých konjugátů a ředících roztoků.

3.5.2. Stanovení protilátek proti *Le. infantum*

ELISA test byl použit také v případě stanovení protilátek v séru psů z Rumunska proti povrchovým antigenům *Le. infantum*. Postup tohoto testu je obdobný jako v předchozí kapitole s následujícími úpravami.

Zásobní roztok *Le. infantum* připravený dle kapitoly 3.3 byl rozmražen a naředěn navazovacím roztokem na koncentraci 1×10^6 buněk / jamku mikrotitrační destičky. Takto připravený antigen byl nanesen na destičku, která byla inkubována dvě hodiny v 37 °C. Jako blokovací roztok bylo použito 6% nízkotučné mléko. Jednotlivé vzorky byly ředěny 1 : 400 do 2% nízkotučného mléka. Konjugát byl ředěn 1 : 3000. V dalších krocích bylo postupováno stejně jako při stanovení protilátek proti slinám flebotomů. *Tabulka 6* uvádí výrobce a katalogová čísla použitých konjugátů a ředících roztoků.

Použité roztoky:

- Navazovací roztok: 20 mM Na₂CO₃ – NaHCO₃; pH 9,0
- PBS: 15 mM NaCl; 0,3 mM KCl; 0,8 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O; 0,1 mM KH₂PO₄; pH 7,2
- PBS-Tween: PBS; 0,05 % Tween®20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P1379); pH 7,2

Substrátový roztok: 0,11 M Na₂HPO₄ · 12H₂O; 0,5 M kyselina citrónová; pH 5,5;
5M OPD (o-fenylendiamin, Sigma-Aldrich, kat. č. P23938); 0,03 % H₂O₂

Tabulka 5: Podmínky ELISA metody (převzato a upraveno dle Kostalova 2012)

Zvíře	Ředění			Blokování
	Sérum	Ředící roztok	Konjugát	
Skot	1 : 200	2% slepičí sérum	1 : 10000	6% slepičí sérum
Ovce	1 : 50	2% koňské sérum	1 : 10000	6% koňské sérum
Koza	1 : 50	2% králičí sérum	1 : 5000	6% králičí sérum
Osel	1 : 50	2% králičí sérum	1 : 5000	6% králičí sérum
Pes	1 : 200	2% mléko	1 : 3000	6% nízkotučné mléko
Myš	1 : 200	2% mléko	1 : 1000	6% nízkotučné mléko

Tabulka 6: Použité konjugáty a ředící roztoky

Zvíře	Konjugát, kat. č.	Ředící roztok, kat. č.
Skot	Goat Anti Bovine IgG, JIR, 101-035-003	Slepičí sérum, Vector, kat. č. S-3000
Ovce	Rabbit Anti Sheep IgG, Novus Biological, NB7195	Koňské sérum, Gibco, kat. č. 16050-122
Koza	Rabbit Anti Goat IgG, Novus Biological, NB710-H	Králičí sérum, Vector, kat. č. S-5000
Osel	Rabbit Anti Donkey IgG (Novus Biological), NB120-6765	
Pes	Sheep Anti Dog IgG, Bethyl, A40-118P	Nízkotučné mléko, Bio-Rad, 170-6404
Myš	Goat Anti Mouse IgG, Serotec, STAR120P	

3.6. Nested PCR

Pro zjištění přítomnosti nákazy *Leishmania* sp. u rumunských psů byla použita nested PCR, která má vyšší specifitu než normální PCR. Při nested PCR dochází k amplifikaci delší části sekvence, pomocí primerů specifických pro sekvence například pro vyšší taxonomickou jednotku, do které patří organismus, jehož přítomnost ve vzorku nás zajímá. Ve druhém kroku nested PCR je použit produkt první reakce jako templátová DNA. Primery pro druhou PCR reakci jsou zpravidla specifické pro určitý rod či druh organismu, jehož přítomnost ve vzorku testujeme.

Pomocí této metody byla testována DNA izolována z krve 214 psů (viz *Tabulka 4*). Jednotlivé reakce byly míchány do celkového objemu 22 µl. Do PCR mikrozkušavek (Axygen, PCR® tubes 0,2ml, 321-02-131) se pipetovalo 10 µl PCR vody (Top Bio), 10 µl mastermixu (Top Bio s.r.o., Combi PPP Mastermix 1000 reakcí, kat. č. C 210) obsahujícího

2× koncentrované Mg^{2+} ionty. Poté bylo přidáno po 0,5 μ l forward a 0,5 μ l reverse primeru pro vnější oblast genu malé ribosomální podjednotky kinetoplastid (sekvence primerů v *Tabulka 7*). Nakonec byla přidána DNA vzorku, která sloužila jako templátová DNA pro PCR reakci. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek totální DNA *Leishmania*-pozitivního pacienta (MCAN/PT/2005/IMT 373, izolát z pacienta, RNDr. MUDr. František Stejskal, Ph.D.⁸, Česká republika, 2013). Jako negativní kontrola sloužil mastermix smíchaný s PCR vodou a přidanými primery. Pro nested PCR amplifikaci delší části genu s vnějšími oblastmi byl použit program Leish SSU 1,2 (podmínky reakce jsou shrnuty v *Tabulce 8*).

PCR směs pro amplifikaci vnitřních oblastí genu pro malou ribosomální podjednotku leishmanií byla připravena obdobně jako v prvním kroku, s tím rozdílem, že jako templátová DNA byla použita DNA amplifikovaná v předchozí reakci a byly přidány primery pro vnitřní oblast sekvence (*Tabulka 7*). Na cycleru byl nastaven program Leish SSU 3,4 (podmínky reakce jsou shrnuty v *Tabulka 8*). Pro obě reakce byl použit PCR cykler BioRad T100™ Thermal Cycler.

Pro ověření úspěšnosti obou kroků PCR byla využita horizontální agarózová elektroforéza. Vzorky byly nanášeny po 10 μ l do 1% agarózového gelu (Agarose electrophoresis grade, Invitrogen™, kat. č. 15510-027) obarveného SYBR safe (Invitrogen, kat. č. S33102), díky kterému jsou DNA bandy v gelu viditelné pod modrým světlem. Pro určení velikosti fragmentů DNA byl zvolen žebříček GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0322). Separace DNA v gelu probíhala při napětí 130 V.

Gely ve kterých byly DNA fragmenty po elektroforéze rozděleny podle velikostí, byly vyfoceny pod modrým světlem a vyhodnoceny.

Tabulka 7: Použité primery pro nested PCR (převzato a upraveno podle van Eys Guillaume J.J.M. and kol. 1992)

Popis primeru			Sekvence primeru
Amplifikace vnějších oblastí (specifita kinetoplastida)	R221 Lei-SSU1	Forward	GGTTCCTTTCTGATTACG
	R332 Lei-SSU2	Reverse	GGCCGGTAAAGGCCGAATAG
Amplifikace vnitřních oblastí (specifita leishmanie)	R223 Lei-SSU3	Forward	TCCCATCGCAACCTCGGTT
	R333 Lei-SSU4	Reverse	AAAGCGGGCGCGGTGCTG

⁸ Klinika infekčních a tropických nemocí 1. LF UK v Praze a FN Na Bulovce, Praha, Česká republika

Tabulka 8: Použité PCR programy

Program:	Leish SSU 1,2 (30 cyklů reakce)		Leish SSU 3,4 (30 cyklů reakce)	
	teplota	čas	teplota	čas
Denaturace DNA	94 °C	5 min	94 °C	5 min
	94 °C	30 sek	94 °C	30 sek
Nasedání primerů	60 °C	30 sek	65 °C	30 sek
Vlastní syntéza DNA	72 °C	30 sek	72 °C	30 sek
	72 °C	5 min	72 °C	5 min

Použité roztoky:

- TAE Pufr pro míchání agarózového gelu: 2% TAE buffer molecular biology grade (tris-acetate-EDTA), Appli Chem, kat. č. A4686

3.7. Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení výsledků ze sérologických testů byl použit program NCSS 6.0.21 (Hintze 1996). Porovnání naměřených hodnot OD mezi jednotlivými lokalitami bylo vyhodnoceno neparametrickým Wilcoxon Rank-Sum Test for Differences in Medians. Pro vyhodnocení dvou proměnných (OD) od stejného vzorku byla použita Spearman Rank Correlation Matrix. Jako hladina signifikance byla zvolena hodnota $p < 0,05$.

V případě sér z jednotlivých etiopských lokalit byl určován statistický rozdíl pouze mezi lokalitami, ve kterých byla séra odebírána ve stejném období, tzn. Addis Zemen a Sheraro. Druhá sada vzorků z lokality Humera byla odebírána o dva měsíce později (konec listopadu 2010).

Hodnoty cut-off byly stanoveny jako průměr negativních kontrol s přičteným dvojnásobkem směrodatné odchylky. V případě měření hladin protilátek proti *Leishmania* spp. byla hodnota cut-off zvolena jako průměr negativních kontrol s přičteným trojnásobkem směrodatné odchylky.

4. Výsledky

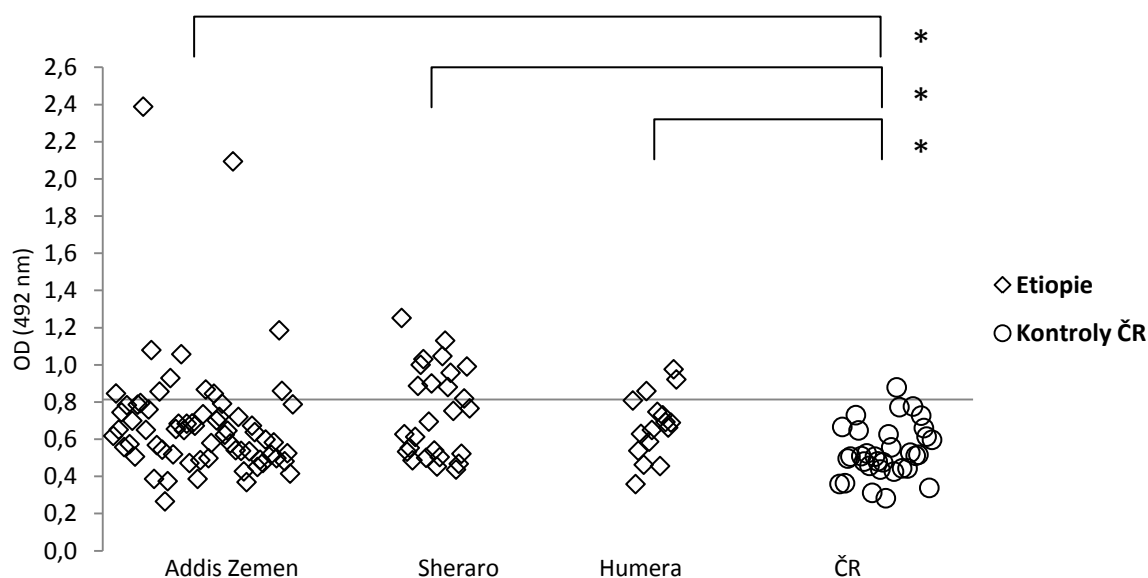
4.1. Protilátková odpověď proti pobodání *S. schwetzi* u domácích zvířat v Etiopii

Seropozitivita domácích zvířat v Etiopii na protilátky proti slinným antigenům *S. schwetzi* byla porovnávána se seropozitivitou kontrolních domácích zvířat z České republiky a v případě psů se zvířaty z laboratorního chovu. Ze všech sér z Etiopie bylo 30 % pozitivních (183/603). Seropozitivita v jednotlivých lokalitách byla: Addis Zemen 12,4 % pozitivních (15/121), Sheraro 28 % (47/168), Humera 38,5 % (121/314). Mezi lokalitou Addis Zemen a Sheraro nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ($p = 0,813$).

4.1.1. Protilátková odpověď u skotu

Mezi séry z Etiopie a českými kontrolními séry byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ($p = 0,0005$). Z celkem 108 odebraných sér u etiopského skotu bylo 23 % pozitivních (25/108) na protilátky proti slinám *S. schwetzi*. Hodnota cut-off byla v tomto případě nezvykle vysoká ($OD = 0,8142$) a nad její hodnotou se nacházel i jeden vzorek z kontrolní skupiny. Hladiny protilátek byly ve všech lokalitách signifikantně vyšší než u kontrolních sér ($p = 0,002$ pro Addis Zemen, $p < 0,001$ pro Sheraro, $p = 0,008$ pro Humeru).

Jedenáct z celkem 66 sér (16,7 %) z lokality Addis Zemen přesáhlo hodnotu cut-off. U sér z lokality Addis Zemen byl zaznamenán velký rozptyl hladiny protilátek, hodnoty OD se pohybují v rozmezí 0,266 a 2,389. V lokalitě Sheraro bylo pozitivních 11 sér z 26 (42,3 %). Mezi těmito lokalitami ovšem nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ($p = 0,143$). Ve třetí lokalitě Humera bylo pozitivních 18,8 % (3/16). Výsledky shrnuty v Grafu 1).

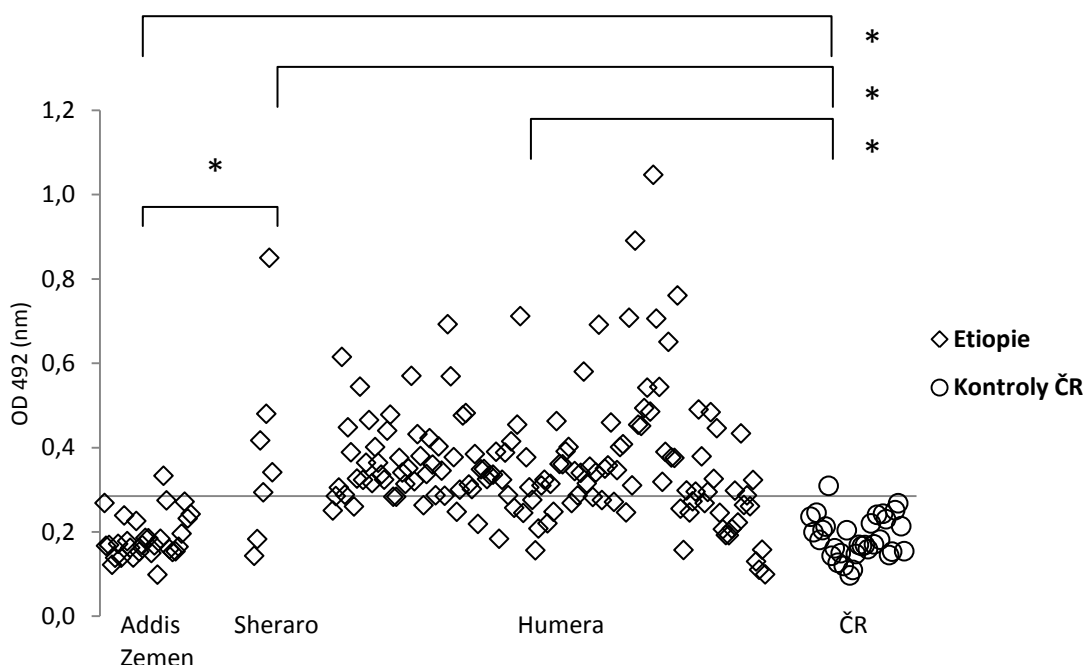


Graf 1: IgG protilátková odpověď proti slinným antigenům *S. schwetzi* u skotu v Etiopii (hodnota cut-off $OD = 0,8142$ označena vodorovnou čarou; * značí $p < 0,05$)

4.1.2. Protilátková odpověď u ovcí

Mezi sadou kontrolních sér ovcí z České republiky a sadou z Etiopie byl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,0001$) (Graf 2). Z celkových 181 ovčích sér odebraných v Etiopii překročilo hodnotu cut-off (OD = 0,2849) 115 sér (63 %). V lokalitách Sheraro ($p < 0,0001$) a Humera ($p < 0,0001$) byla zjištěna signifikantně vyšší hladina protilátek než u sér z kontrolní skupiny. Mezi lokalitou Addis Zemen a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ($p = 0,877$). V jednotlivých etiopských lokalitách byl nejnížší počet pozitivních sér v lokalitě Addis Zemen a to pouze jedno sérum z celkových 30 (3,3 %). Z lokality Sheraro jsme měli k dispozici jen 7 sér, z nichž bylo 5 nad hodnotou cut-off (71 %). V lokalitě Addis Zemen byla seropozitivita signifikantně nižší než v lokalitě Sheraro ($p = 0,009$). Nejvíce ovčích sér bylo získáno z lokality Humera, celkem 144 sér, ze kterých bylo 75,7 % pozitivních (109).

Hodnotu cut-off překročil také jeden vzorek z kontrolní skupiny.

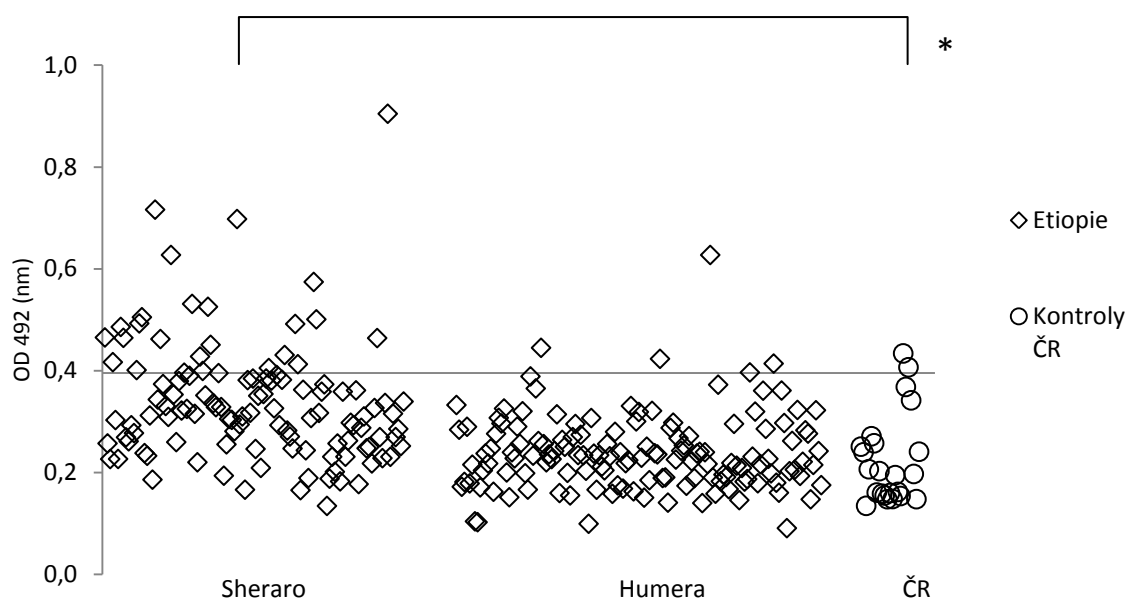


Graf 2: IgG protilátková odpověď proti slinnému antigenu *S. schwetzi* u ovcí v Etiopii
(hodnota cut-off OD = 0,2849 označena vodorovnou čarou; * značí $p < 0,05$)

4.1.3. Protilátková odpověď u koz

Hladiny IgG protilátek proti slinám *S. schwetzi* u kozích sér z Etiopie byly signifikantně vyšší než u sér českých koz ($p = 0,002$). Celkově bylo v Etiopii odebráno 253 sér, z nichž bylo 31 sér pozitivních (12 %). V lokalitě Sheraro bylo 22,8 % sér (26/144) pozitivních. Hodnoty OD u vzorků z této lokality byly signifikantně vyšší ($p < 0,0001$) než OD kontrolní skupiny, což je patrné z *Grafu 3*. V lokalitě Humera překročilo hodnotu cut-off (OD = 0,3954) 3,6 % sér (5/139). Mezi hladinami protilátek v sérech z této lokality a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ($p = 0,115$). Z lokality Addis Zemen nebylo odebráno žádné kozí sérum.

Nad hodnotu cut-off se dostaly také dvě séra z kontrolní skupiny z České republiky.



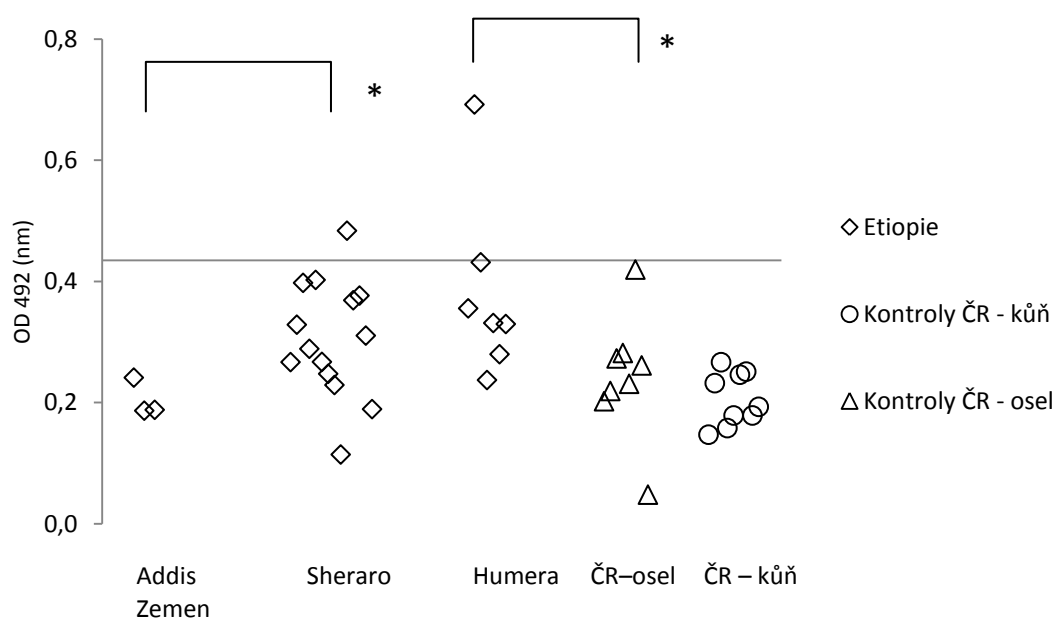
Graf 3: IgG protilátková odpověď proti slinnému antigenu *S. schwetzi* u koz v Etiopii (hodnota cut-off OD = 0,3954 označena vodorovnou čarou; * značí $p < 0,05$)

4.1.4. Protilátková odpověď u oslů

U protilátkové odpovědi typu IgG proti slinám *S. schwetzi* mezi etiopskými oslími séry a séry kontrolními (z českých oslů a koní) nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl ($p = 0,151$). Z celkových 24 sér z Etiopie bylo 8,3 % pozitivních (2 séra). Mezi jednotlivými lokalitami a kontrolní skupinou českých oslů nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v případě sér z Addis Zemen a Sheraro ($p = 0,221$ respektive $p = 0,172$). Hladina protilátek byla signifikantně vyšší jen v lokalitě Humera ($p = 0,028$).

V lokalitě Sheraro bylo 7 % vzorků pozitivních (1/14). V lokalitě Humera bylo 14,3 % vzorků pozitivních (1/7). Z lokality Addis Zemen jsme měli k dispozici pouze 3 séra a žádné z nich nepřekročilo hladinu cut-off. Mezi hodnotami naměřenými pro lokalitu Addis Zemen a lokalitu Sheraro byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ($p = 0,04$).

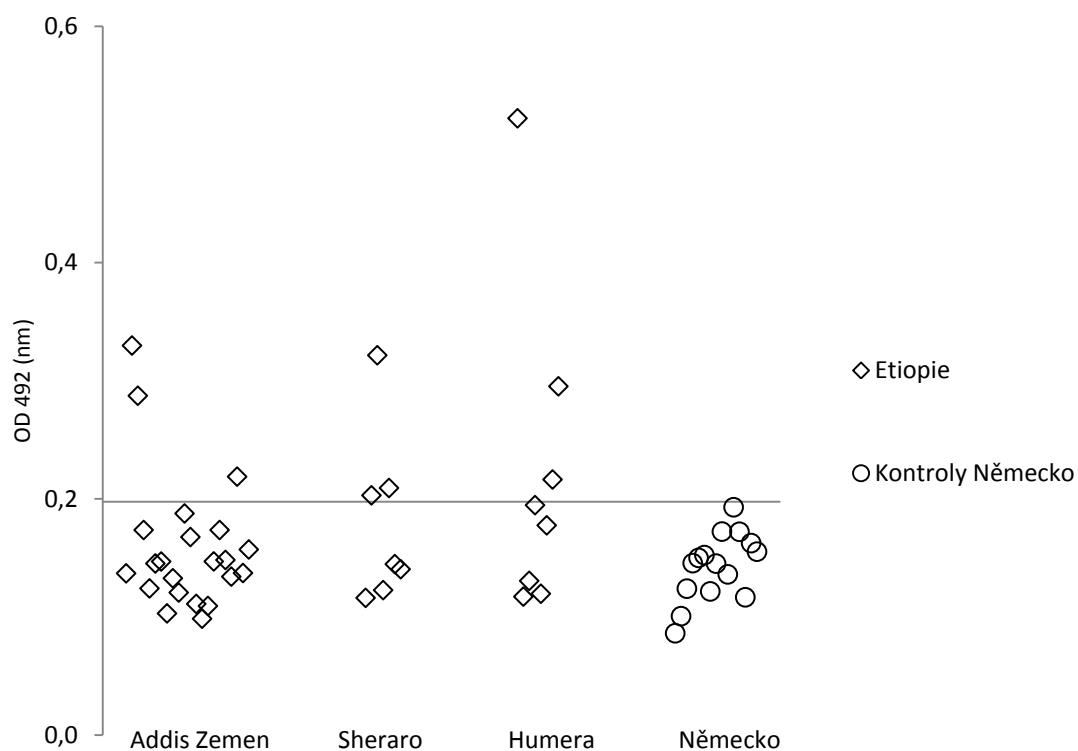
Jako negativní kontroly zde byly použity, jak séra z koní, tak i séra z oslů, jelikož jsme chtěli otestovat, zdali se dají využít koňská séra jako negativní kontroly, pokud by nebylo možné sehnat kontrolní oslí séra. Rozptyl OD (0,147 – 0,420) koňských sér vycházel velmi podobně jako rozptyl OD oslích sér (0,147 – 0,246) a nebyl mezi nimi statisticky signifikantní rozdíl. Zobrazeno v *Grafu 4*.



Graf 4: IgG protilátková odpověď proti slinnému antigenu *S. schwetzi* u oslů v Etiopii (hodnota cut-off OD = 0,4348 označena vodorovnou čarou; * značí $p < 0,05$)

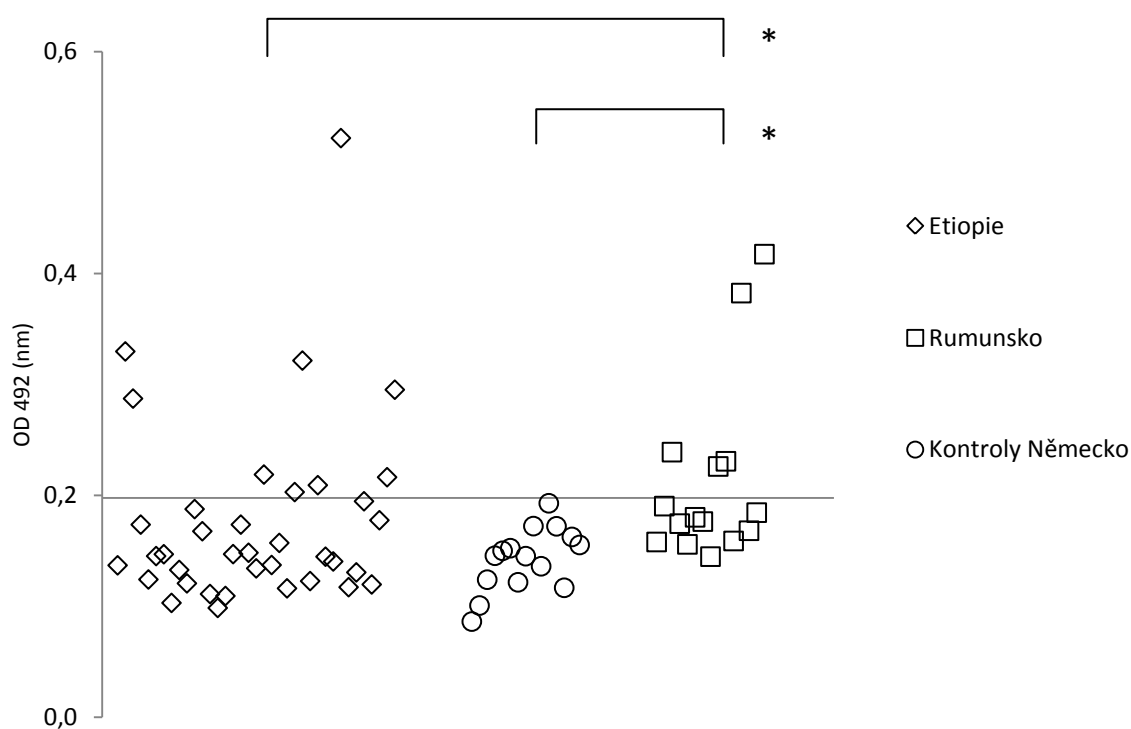
4.1.5. Protilátková odpověď u psů

V protilátkové odpovědi proti antigenům *S. schwetzi* u psích sér z Etiopie nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl ($p = 0,327$) oproti negativním kontrolním sérům. Mezi jednotlivými lokalitami a kontrolní skupinou také nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ($p = 0,687$ Addis Zemen, $p = 0,459$ Sheraro, $p = 0,106$ Humera). Z celkových 37 odebraných sér přesáhlo hodnotu cut-off ($OD = 0,197$) jen 10 sér, což je 3,7 %. Nejvíce pozitivních sér (4/7) bylo zaznamenáno v lokalitě Sheraro (57 %). V lokalitě Humera bylo 37,5 % sér pozitivních (3/8). Nejméně pozitivních vzorků bylo zjištěno v Addis Zemen (3/22), jen 13,6 %. Mezi hodnotami z lokalit Addis Zemen a Sheraro nebyl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl ($p = 0,575$). Jako negativní kontroly byla použita séra z laboratorního chovu psů z Německa.



Graf 5: IgG protilátková odpověď proti slinnému antigenu *S. schwetzi* u psů v Etiopii
(hodnota cut-off OD = 0,197 označena vodorovnou čarou)

Jelikož v tomto pokusu sloužily jako kontroly laboratorní psi, kteří nebyli vystaveni vlivům mimo laboratoř, použili jsme pro porovnání 15 sér volně žijících psů z Rumunska. Jedna třetina ze psů z Rumunska (33,3 %) mělo hodnoty hladin protilátek nad hranicí cut-off (*Graf 6*). Tyto hodnoty hladin protilátek jsou signifikantně vyšší ($p = 0,005$) než hodnoty protilátek u kontrolní skupiny psů z Německa. Stejně tak byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ($p = 0,012$) mezi séry psů z Etiopie a vzorky rumunských psů, kdy měly vzorky z Etiopie hladiny protilátek vyšší.



Graf 6: Porovnání IgG protilátkové odpovědi proti slinnému antigenu *S. schwetzi* u psů v Etiopii a psů v Rumunsku (hodnota cut-off OD = 0,197 označena vodorovnou čarou; * značí $p < 0,05$)

4.2. Zkřížené reakce antigenů a protilátek *S. schwetzi*, *P. orientalis* a dalších flebotomů

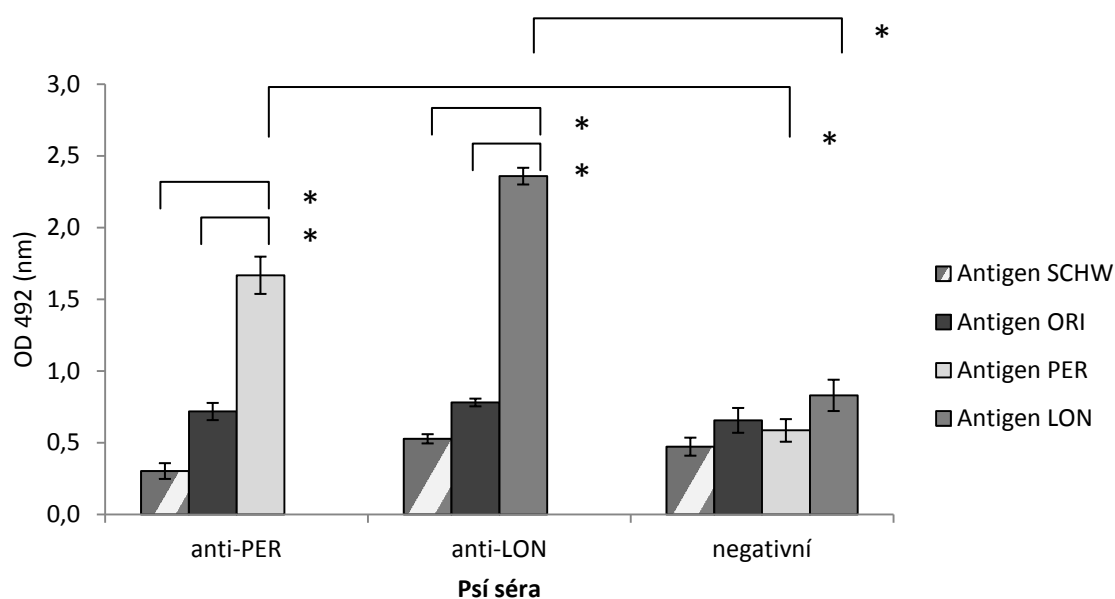
Pro správnou interpretaci výsledků z ELISA testů bylo třeba zjistit, zda mezi *S. schwetzi* a dalšími vybranými druhy flebotomů nedochází k tzv. zkříženým reakcím antigenů *S. schwetzi* s protilátkami proti jiným druhům flebotomů. Během tohoto pokusu jsme také zjišťovali specifitu protilátek proti slinám *S. schwetzi* vůči slinným proteinům vybraných druhů flebotomů.

Pro testování zkřížených reakcí byly použity pouze séra laboratorních psů a myší, které byly imunizované pouze jedním druhem flebotoma. Séra od dalších druhů zvířat, která by byla vystavená pobodání pouze jednoho druhu flebotoma, nebyla k dispozici.

4.2.1. Zkřížené reakce u psích sér

Vybraná séra jsme testovali na slinném antigenu (slinných žlázách) *S. schwetzi* (SCHW) a *P. orientalis* (ORI). K dispozici jsme měli séra psů z laboratorního chovu, kteří byli vystavení pobodání pouze *P. perniciosus* (anti-PER) nebo pouze *L. longipalpis* (anti-LON).

Jako druhý testovaný antigen k *S. schwetzi* jsme použili slinné žlázy *P. orientalis*. Séra ze psů imunizovaných jen *S. schwetzi* či jen *P. orientalis* jsme neměli k dispozici. Jako pozitivní kontrola byly zvoleny antigeny shodné s příslušným sérem (slinné žlázy *P. perniciosus*, *L. longipalpis*). Jako negativní kontroly byla použita séra neimunizovaných psů ze stejného laboratorního chovu.



Graf 7: Zkřížené reakce u psích sér (SCHW = antigen *S. schwetzi*, ORI = antigen *P. orientalis*, PER = antigen *P. perniciosus*, LON = antigen *L. longipalpis*, anti-PER séra psů imunizovaných *P. perniciosus*, anti-LON séra psů imunizovaných *L. longipalpis*, negativní séra neimunizovaných psů; * značí $p < 0,05$, chybová úsečka značí směrodatnou chybu)

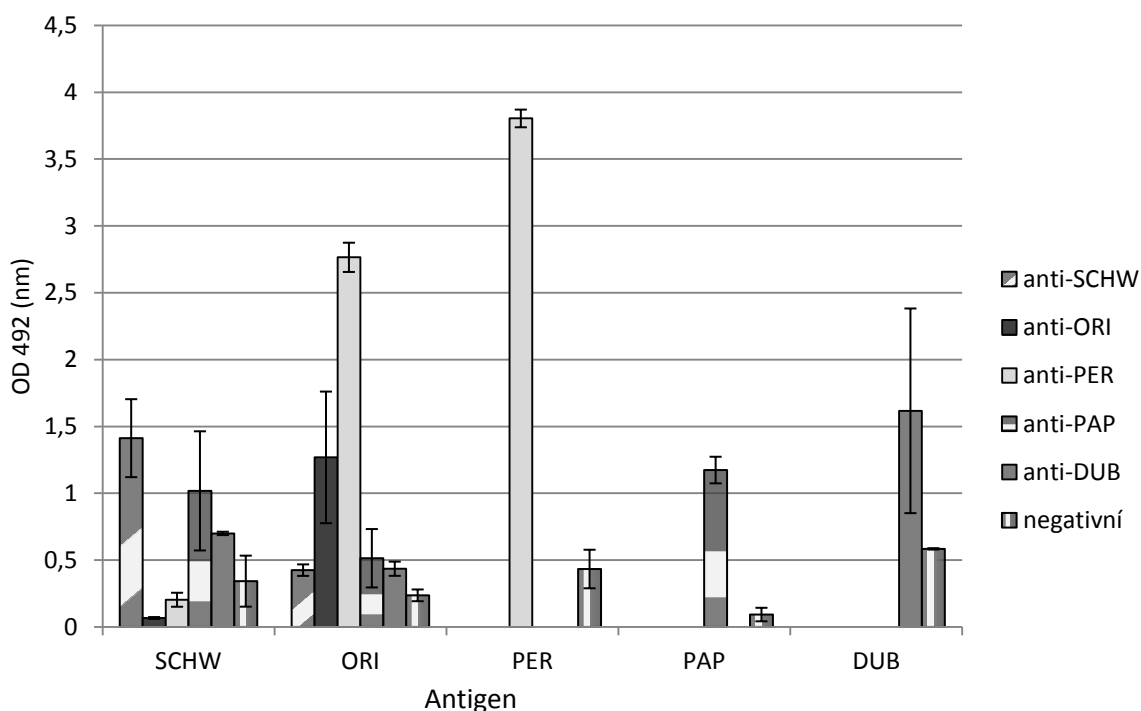
Z Graf 7 je patrné, že nejvíce reagovaly séra s homologním antigenem ze shodného druhu flebotoma, jakým byly daní psi imunizováni. U antigenu SCHW se hodnoty OD naměřené u jednotlivých sér z pobodaných psů nelišily od negativní kontroly. Podobný výsledek jsme získali i s antigenem *P. orientalis*.

Séra ze psů imunizovaných pouze *P. perniciosus* (anti-PER) reagovala nejvíce s homologním antigenem (žlázy *P. perniciosus*), kdy byly hladiny protilátek trojnásobně vyšší než u sér neimunizovaných psů ($p = 0,009$). Reakce anti-PER séra s antigenem SCHW se nelišilo od negativního séra ($p = 0,076$). Stejně tak tomu bylo i při testování séra anti-PER s antigenem ORI ($p = 0,602$). Tyto výsledky jsou podpořeny statisticky signifikantními rozdíly ($p = 0,043$) mezi jednotlivými antigeny (SCHW, ORI, PER) testovanými na séru anti-PER, kdy jsou hodnoty pro SCHW i pro ORI signifikantně nižší než pro antigen PER.

Výsledky pro testování jednotlivých antigenů na sérech psů imunizovaných pouze *L. longipalpis* (anti-LON) byly obdobné. Hladiny protilátek v séru anti-LON testovaném na antigenu LON jsou signifikantně vyšší ($p = 0,009$) než hladiny naměřené pro negativní séra. Hodnoty hladin protilátek těchto sér testovaných na antigenu SCHW (rozmezí OD 0,407 – 0,668) a na antigenu ORI (rozmezí OD 0,746 – 0,897) nebyly signifikantně vyšší než u kontrolních sér z neimunizovaných psů ($p = 0,602$ pro SCHW, $p = 0,117$ pro ORI).

4.2.2. Zkřížené reakce u myších sér

Pro testování zkřížených reakcí na myším modelu jsme vybrali séra z myší specificky imunizovaných *S. schwetzi* (anti-SCHW), *P. orientalis* (anti-ORI), *P. perniciosus* (anti-PER), *P. papatasi* (anti-PAP) nebo *P. duboscqi* (anti-DUB). Jako antigen sloužily žlázy ze stejných druhů flebotomů (SCHW, ORI, PER, PAP, DUB). Séra z myší imunizované *S. schwetzi* a *P. orientalis* jsme testovali na všech zmíněných antigenech. Jako pozitivní kontroly jsme vždy použili sérum z myší imunizované druhem flebotoma, ze kterého byl daný antigen. Jako negativní kontroly sloužily séra z neimunizovaných myší. Vzhledem k malému počtu použitých sér ($n = 2$) jsme výsledky nevyhodnocovali statisticky.



Graf 8: Zkřížené reakce antigenů *S. schwetzi* a dalších vybraných druhů flebotomů na myším modelu (anti-SCHW séra myší imunizovaných *S. schwetzi*, anti-ORI séra myší imunizovaných *P. orientalis*, anti-PER séra myší imunizovaných *P. perniciosus*, anti-PAP séra myší imunizovaných *P. papatasi*, anti-DUB séra myší imunizovaných *P. duboscqi*, negativní séra neimunizovaných myší; chybová úsečka značí směrodatnou chybu)

Naměřené hladiny protilátek u sér testovaných na homologním antigenu byly vždy vyšší než u sér negativních. Negativní séra reagovala se všemi antigeny podobně, avšak reakce negativního séra na antigenu PAP byla proti reakcím s ostatním antigenům velmi nízká (OD = 0,093).

Hladiny protilátek anti-SCHW testovaných na SCHW (OD = 1,412) byly 4× vyšší než u negativního séra (OD = 0,342). V případě hladin protilátek anti-ORI testovaných na homologním antigenu (OD = 1,269) byly 5× vyšší než u sér negativních na ORI (OD = 0,236). Naměřené hladiny protilátek v séru myši imunizované *P. perniciosus* na antigenu PER (OD = 3,804) byly více než 8× vyšší než v séru myši neimunizované na stejném antigenu. U sér anti-PAP s homologním antigenem byly zjištěné hladiny protilátek (OD = 1,174) 12× vyšší než reakce séra negativního testovaného na PAP. Hladina protilátek v séru myši anti-DUB (OD = 1,617) testovaná na homologním antigenu byla oproti negativním sérům na antigenu DUB (OD = 0,584) vyšší skoro 7×.

Na antigen SCHW se nevázaly protilátky anti-PER a anti-ORI; naměřené hladiny protilátek byly srovnatelné či nižší než u negativních sér na antigenu SCHW. Částečnou zkříženou reakci jsme pozorovali s protilátkami proti PAP (OD = 1,017). Při porovnání s hladinou protilátek u homologního antigenu, byly jen 0,7× nižší.

S antigenem ORI reagovaly kromě homologního séra též protilátky ze séra myši imunizované *P. perniciosus* (OD = 2,765). V tomto případě byla hladina protilátek v séru anti-PER reagující na ORI antigen dokonce 2× vyšší než u homologního séra. Hladiny protilátek proti ostatním testovaným druhům flebotomů (SCHW, PAP, DUB) byly srovnatelné s negativní kontrolou. Při porovnání hladiny protilátek v séru anti-SCHW v reakci na ORI antigen (OD = 0,425), byly tyto hodnoty skoro 3× nižší než v reakci na antigen *P. orientalis* homologním séru.

4.3. Protilátková odpověď proti *Le. infantum* u psů v Rumunsku

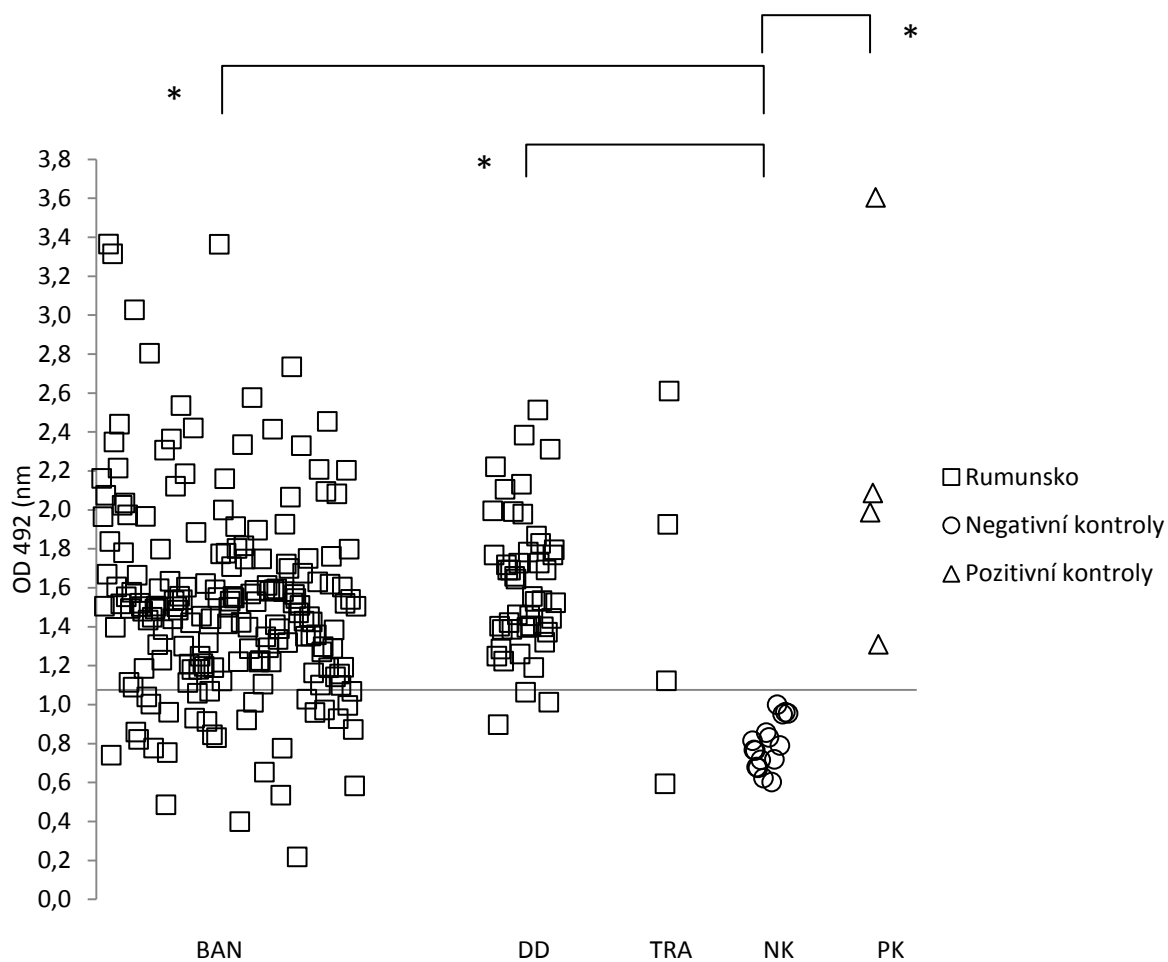
Protilátková odpověď typu IgG proti antigenům *Le. infantum* u psů v Rumunsku byla porovnávána pomocí metody ELISA s protilátkovou odpovědí psů z laboratorního chovu v Německu, kteří posloužili jako negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byla zvolená psí séra z italských studií (viz kapitola 3.1.). Rumunské vzorky psích sér byly odebírány ze třech různých lokalit v letech 2009 až 2012.

Z celkových 238 rumunských sér bylo 204 (85,7 %) nad hodnotou cut-off, která byla v tomto případě nezvykle vysoká (OD = 1,076), hodnoty OD negativních kontrolních sér německých psů se nacházely v intervalu mezi 0,602 až 0,999. Stejně tak byly nezvykle vysoké všechny naměřené hodnoty OD vzorků, kde byl medián hladiny protilátek v rumunských sérech 1,5073. I přes-to byl rozdíl mezi rumunskými a německými séry signifikantní ($p < 0,0001$).

Hladiny protilátek psích sér z oblasti Banátu byly signifikantně vyšší než hladiny protilátek kontrolních psů ($p < 0,0001$). Stejně tak tomu bylo i v případě psů z oblasti Delt Dunaje ($p < 0,0001$). Mezi séry psů z Transylvánie a kontrolní skupinou nebyl signifikantní rozdíl ($p = 0,131$).

V jednotlivých lokalitách v Rumunsku bylo nejvíce sér nad hodnotou cut-off v oblasti Delt Dunaje 93,6 % (44/47). V oblasti Banátu přesáhlo hodnotu cut-off 83,9 % vzorků (157/187). Ze třetí oblasti, Transylvánie, byly k dispozici pouze 4 séra, z nichž byly 3 nad hodnotou cut-off (75 %).

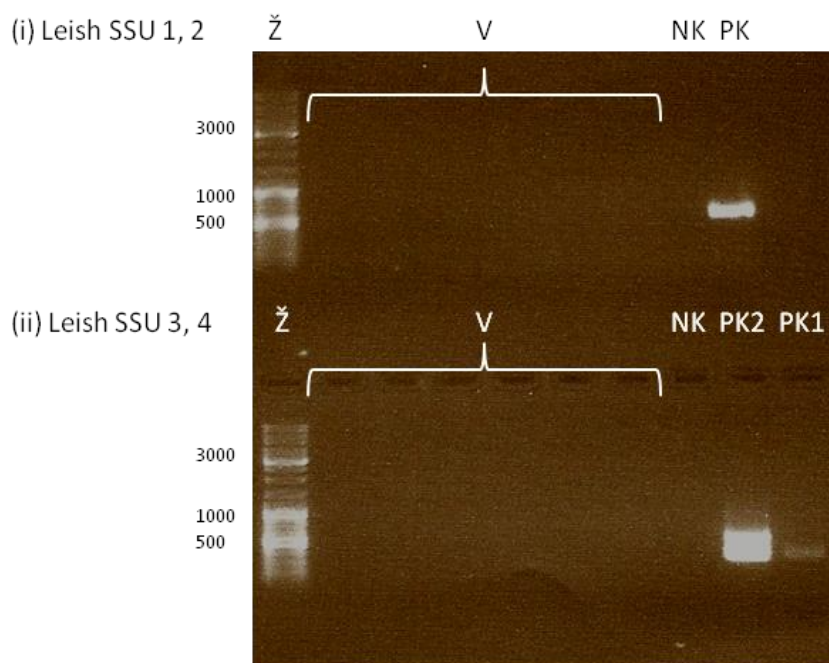
Mezi hladinami protilátek u sér z jednotlivých lokalit nebyl signifikantní rozdíl.



Graf 9: anti-*Le. Infantum* IgG protilátky u psů v Rumunsku (BAN Banát, DD Delta Dunaje, TRA Transylvánie, NK negativní kontroly, PK pozitivní kontroly, hodnota cut-off OD = 1,076 označena vodorovnou čarou)

4.4. Diagnostika *Leishmania* sp. v krvi psů z Rumunska pomocí nested PCR

Pomocí nested PCR bylo otestováno 214 vzorků DNA vyizolované z krve rumunských psů. Jednotlivé vzorky byly odebírány ze třech různých lokalit od října roku 2009 do října roku 2012. Žádný z těchto vzorků DNA nebyl PCR pozitivní ani na leishmanie ani na kinetoplastida. Dvojitý band v pozitivní kontrole (PK2) na *Obrázek 3* je způsoben, zbytkem primerů z první reakce Leish SSU 1, 2, díky nimž se amplifikovala i delší sekvence charakteristická pro kinetoplastida.



Obrázek 3: Agarózový gel z horizontální gelové elektroforézy – detekce DNA *Leishmania* sp. z krve rumunských psů:

(i) **Leish SSU 1, 2** – **Ž** žebříček, **V** vzorky DNA psů, **NK** negativní kontrola, **PK** – pozitivní kontrola (s primery Lei 1, 2)

(ii) **Leish SSU 3, 4** – **Ž** žebříček, **V** vzorky DNA psů, **NK** negativní kontrola, **PK1** pozitivní kontrola z 1. PCR reakce (bez primerů Lei 3, 4), **PK2** pozitivní kontrola (s primery Lei 3, 4)

5. Diskuze

Flebotomové rodu *Sergentomyia* jsou obecně známí svou preferencí sát na poikilotermních obratlovcích, avšak podle mnoha studií jsou někteří zástupci tohoto rodu ochotní sát i na savcích (Quate 1964, Perfilev 1968, Davidson 1979, Hassan and kol. 2009). Při sání flebotoma na hostiteli dochází k uvolnění jeho slin do rány, na což hostitel při opakovaném sání reaguje tvorbou specifických protilátek proti proteinům obsaženým ve flebotomých slinách. Pomocí sérologického stanovení hladin těchto protilátek je možné zjistit, zda na daném zvířeti sál flebotom (Rohousova and Volf 2006, Andrade and Teixeira 2012). Tohoto jevu jsme využili pro průkaz, zda *Sergentomyia schwetzi* saje na savcích – konkrétně na domácích zvířatech z lokalit viscerální leishmaniózy v severozápadní Etiopii a zda tak může být daný druh zvířete případně zapojen v cyklu přenášeného patogenu.

Z pěti testovaných druhů domácích zvířat byl rozdíl hladin IgG protilátek proti slinám *S. schwetzi* signifikantně vyšší oproti kontrolním sérům u skotu, koz a ovcí. Signifikantní rozdíl hladin protilátek nebyl mezi séry psů z Etiopie a kontrolními séry. Stejně tak nebyl zjištěn rozdíl hladin protilátek u oslů.

Nejvíce pozitivních sér z Etiopie bylo u ovcí (64 %), a skotu (23 %). Nejméně pak u psů (3,7 %), oslů (8,3 %) a koz (12 %). Při porovnání lokality Addis Zemen a Sheraro pro jednotlivé druhy zvířat byl zaznamenán signifikantní rozdíl jen u ovcí a oslů, kdy hladina protilátek byla vyšší v oblasti Sheraro než Addis Zemen. Je otázkou, zdali na tento výsledek nemá vliv velikost porovnávaného vzorku, jelikož vzorek z lokality Sheraro byl u ovcí velmi malý (7 sér), zatímco u oslů byl velmi malý vzorek z lokality Addis Zemen (3 séra). U koz jsme pak obě lokality nemohli porovnat z důvodu absence vzorků z oblasti Addis Zemen.

To, že flebotomové rodu *Sergentomyia* sají jen na studenokrevných obratlovcích, popírá v průběhu let mnoho studií (Quate 1964, Perfilev 1968, Lambert and kol. 2002, Senghor and kol. 2011). Mimo to i v naší laboratoři jednu z kolonií *S. schwetzi* dlouhodobě udržujeme tak, že její samice sajeme jen na myších. Také naše sérologické výsledky u domácích zvířat z Etiopie naznačují, že samice *S. schwetzi* na domácích zvířatech v severovýchodní a severní Etiopii pravděpodobně sají. V Keni se vědci domnívají, že *S. ingrami* saje na hlodavcích, jelikož při odchycích v okolí hlodavčích nor, byly počty odchycených samic velice vysoké. Mimo to využívá *S. ingrami* tyto hlodavčí nory i jako

místo odpočinku přes horké dny (Mutinga and kol. 1986). Díky tomu, že *S. ingrami* sdílí konkrétní místo výskytu s hlodavcem (který je pravděpodobným rezervoárem nákazy leishmaniózy), se dá říci, že splňuje dva z bodů pro to, aby mohla být vektorem leishmaniózy. Konkrétně stejné místo výskytu s rezervoárovým hostitelem, na kterém pravděpodobně sají krev. Pro určení na jakém druhu zvířat flebotomové sají, je možné využít PCR amplifikace specifického cytochromu-b (Svobodová and kol. 2009, Poche and kol. 2012).

Jako kontrolu pro séra z etiopských oslů jsme, mimo oslů z České republiky, použili séra koní (také z České republiky). Chtěli jsme takto otestovat, zda by se dala koňská séra použít jako kontroly, pokud by oslí séra nebyla k dispozici. Mezi hladinou protilátek proti slinným antigenům *S. schwetzi* nebyl mezi oběma skupinami signifikantní rozdíl, tudíž by se koňská séra pravděpodobně dala použít jako referenční vzorek při testování oslích sér.

Pro testování psích sér jsme zvolili dvě kontrolní skupiny, psi z laboratorního chovu a skupinu psů z Rumunska. K tomu nás vedl fakt, že psi z laboratorního chovu jsou vystaveni minimu dalších faktorů, které mohou protilátkovou odpověď ovlivnit. U psů z Rumunska bylo 33,3 % vzorků pozitivních. Hladiny protilátek u této kontrolní skupiny byly signifikantně vyšší než u laboratorních psů z Německa. Zároveň však byly hladiny protilátek sér rumunských psů signifikantně nižší než protilátky u psů z Etiopie. Tyto výsledky naznačují, že v sérech rumunských psů jsou protilátky, které nespecificky rozeznávají antigeny *S. schwetzi*, jelikož tento druh se v oblasti Rumunska nevyskytuje, ale je zde však přítomný jiný druh sergentomyie (*S. minuta*) (Duport and kol. 1971 citováno podle Zahar 1979) a jiné druhy krevsajícího hmyzu a může tak docházet k vnitro i mezidruhovým zkříženým reakcím.

Mezidruhové zkřížené reakce protilátek mohou vysvětlit i nezvykle vysokou hladinu cut-off u vzorků ze skotu. Důvodem vysokých hladin protilátek u kontrolních sér z České republiky (oblast bez výskytu flebotomů) by mohly být zkřížené reakce se slinnými antigeny jiných krevsajících členovců v České republice přítomných. Zkřížené reakce byly zaznamenány například mezi tiplíky čeledi Ceratopogonidae a muchničkami (Simuliidae) na modelu koní (Schaffartzik and kol. 2010). Práci na téma zkřížených reakcí mezi zástupci podčeledi Phlebotominae a jinými druhy krevsajícího hmyzu je velmi málo, konkrétně na zástupce rodu *Sergentomyia* není žádná. Zkřížené reakce mezi krevsajícími plošticemi (podčeleď Triatominae) a flebotomy *P. duboscqi* a *L. longipalpis* byly testovány

v práci Schwarz and kol. (2009). V této studii sérum ze slepice imunizované *Triatoma infestans* na immunoblotu rozpoznávalo antigeny slinných žláz *P. duboscqi* avšak s *L. longipalpis* nebyla zkřížená reakce zaznamenána (Schwarz and kol. 2009). U laboratorních myší se neprokázaly zkřížené reakce mezi flebotomy (*P. papatasi* a *P. sergenti*) a komáry (*Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*) (Kolářová, osobní sdělení).

Při interpretaci sérologických testů je třeba vzít v úvahu případné zkřížené reakce, ke kterým může docházet také mezi jednotlivými druhy flebotomů. Pokud by protilátky rozpoznávaly slinné antigeny nespecificky, mohlo by dojít k falešné pozitivitě. Na téma zkřížených reakcí mezi jednotlivými druhy flebotomů rodu *Phlebotomus* a *Lutzomyia* bylo publikováno několik prací, které zaznamenaly silnější nebo slabší zkříženou reakci pouze mezi blízce příbuznými druhy. V práci z roku 2001 Volf a Rohoušová identifikují pomocí immunoblotingu a dotblotu částečně zkříženou reakci slinných antigenů *P. (L.) perniciosus* a protilátek proti *P. (A.) halapensis* zatímco ostatní heterologní testované kombinace antigenů a protilátek spolu nereagují. Autoři tento fakt přisuzují bližší příbuznosti podrodů *Adlerius*, do kterého spadá druh *P. (A.) halapensis*, s pordodem *Larroussius*, kam náleží *P. (L.) perniciosus*, zatímco podrod *Phlebotomus* (*P. (P.) papatasi*) je od obou výše zmíněných druhů evolučně vzdálenější (Volf and Rohousova 2001). Se zástupci rodu *Sergentomyia* však obdobná studie zatím nebyla publikována.

Z tohoto důvodu jsme ověřovali zkřížené reakce mezi antigeny *S. schwetzi* a dalšími druhy flebotomů. Pro tyto testy jsme použili pouze séra laboratorních psů a myší, protože séra z jiných zvířat, která by byla specificky imunizována jen jedním druhem flebotoma, jsme neměli k dispozici. V případě testů na psích sérech, byla použita séra ze psů imunizovaných *P. perniciosus* a *L. longipalpis* a jako antigeny byly použity slinné žlázy ze *S. schwetzi* a *P. orientalis*. Oba druhy flebotomů jsou přítomny ve studovaných etiopských oblastech, odkud jsme měli séra domácích zvířat (Gebre-Michael and kol. 2007, 2010), *P. orientalis* byl přidán jako nejpravděpodobnější přenašeč viscerální leishmaniózy v této oblasti (Gebre-Michael and kol. 2007, 2010). Mimo to byla séra z etiopských domácích zvířat již testována na přítomnost protilátek IgG proti antigenu *P. orientalis*, zkřížená reaktivita však byla studována pouze na immunoblotu (Kostalova 2012), což se může lišit od reaktivity v ELISA testu (Drahota and kol. 2009).

Z výsledků zkřížených reakcí lze usoudit, že protilátky ze sér psů imunizovaných *P. perniciosus* nerozpoznávají slinné antigeny *S. schwetzi*. Slinné antigeny *P. orientalis* také nerozpoznávají, přestože *P. perniciosus* a *P. orientalis* jsou si evolučně poměrně blízcí, oba druhy patří do stejného podrodu *Larroussius* (Seccombe and kol. 1993). Protilátky proti *L. longipalpis* nerozpoznávají slinné antigeny *S. schwetzi* ani *P. orientalis*, i když u antigenu *P. orientalis* jsou naměřené hodnoty o něco vyšší. Celkově séra ze psů vystavených pobodání *L. longipalpis* reagují s oběma uvedenými antigeny více než séra obsahující protilátky proti antigenům *P. perniciosus*, avšak rozdíl oproti negativní kontrole byl zaznamenán pouze s homologním antigenem ze slin *L. longipalpis*. Na sérech psů z Etiopie byla testována reakce antigenů *S. schwetzi* s protilátkami obsaženými těchto sérech pomocí imunoblotu v diplomové práci Kostalova (2012). Vybraná testovaná séra byla pozitivní na protilátky proti *P. orientalis*, přičemž ta samá séra rozpoznávala i slinné proteiny *S. schwetzi* avšak s různou mírou intenzity. Díky tomuto pozorování se Mgr. Košťálová domnívá, že *S. schwetzi* sají na psech v Etiopii, avšak s různou mírou intenzity (Kostalova 2012).

Pro testování zkřížených reakcí na myším modelu byly mimo *S. schwetzi* a *P. orientalis*, vybrány další dva druhy flebotomů (*P. papatasi* a *P. duboscqi*), kteří se také vyskytují v oblastech východní Afriky a sají na lidech i zvířatech (Killick-Kendrick 1990). Jako třetí druh flebotoma jsme pro porovnání zkřížených reakcí protilátek proti antigenům slinných žláz vybrali *P. perniciosus*. Takto jsme volili především z důvodu, že tento druh flebotoma patří do podrodu *Larroussius* stejně jako *P. orientalis* (Seccombe and kol. 1993), což nám může poodhalit míru specifity protilátek/antigenu mezi takto blízkými příbuznými druhy, u kterých je možnost zkřížených reakcí vyšší než u fylogeneticky vzdálenějších druhů (Volf and Rohousova 2001, Rohousova and kol. 2005).

Během tohoto pokusu jsme zjišťovali specifitu protilátek proti slinám zmíněných druhů flebotomů vůči slinným proteinům *S. schwetzi* a *P. orientalis*. Séra obsahující protilátky proti slinným antigenům *P. orientalis* a *P. perniciosus* reagovali velmi málo s antigeny slinných žláz *S. schwetzi*. Naopak vyšší hladiny protilátek byly naměřeny při testování sér z myší imunizovaných *P. papatasi* a *P. duboscqi* na antigenu *S. schwetzi*. Oba tyto druhy flebotomů patří do podrodu *Phlebotomus* (Mukhopadhyay and kol. 2000), zatímco *P. orientalis* a *P. perniciosus* náleží do podrodu *Larroussius*. Zdá se tedy, že slinné antigeny *S. schwetzi* zkříženě reagují s protilátkami flebotomů podrodu *Phlebotomus* a naopak nereagují s protilátkami flebotomů podrodu *Larroussius*. Tématu zkřížených reakcí

na myším modelu se zabývala i Mgr. Košťálová, která pomocí imunoblotu testovala vzájemné zkřížené reakce mezi antigeny a protilátkami *P. orientalis* a *S. schwetzi*, ale nepozorovala žádné zkřížené reakce mezi těmito dvěma druhy. Spolu s prací Mgr. Košťálové se tak jedná o první studii zkřížených reakcí protilátek a antigenů flebotomů podrodu *Sergentomyia* s jinými druhy flebotomů. Antigenní specifitu slinných proteinů různých druhů sergentomyií jsme ověřit nemohli, protože jsme měli k dispozici kolonii pouze jednoho druhu rodu *Sergentomyia*.

Otázkou však zůstává, zda lze výsledky získané na myším modelu aplikovat i na další druhy zvířat. Protilátková odpověď může být pro každý druh zvířete specifická, mohou tvořit protilátky proti jiným proteinům ve slinách flebotomů či proti jiným epitopům stejného proteinu, navíc ji ovlivňují další faktory jako aktuální celkový stav daného jedince nebo genetické predispozice (Volf and Rohousova 2001, Vinhas and kol. 2007). Pokud by se daly aplikovat výsledky zkřížených reakcí na našem psím a myším modelu i na další zvířata, mohli bychom z výsledků protilátkové odpovědi proti slinám *S. schwetzi* u domácích zvířat v Etiopii vyvodit, že naměřené hladiny protilátek nejsou zkreslené sáním *P. orientalis*, který se zde také vyskytuje (Elnaiem 2011). Avšak test zkřížených na myších sérech prokázal určitou míru reakce slinných antigenů *S. schwetzi* s protilátkami *P. duboscqi* a *P. papatasi*, kteří se v oblasti Etiopie, odkud byla séra odebírána, vyskytují (Maroli and kol. 2013).

Tyto pokusy nám umožnily podrobnější pohled na to, jestli si flebotomové rodu *Sergentomyia* vybírají pro sání krve také savce, a to konkrétně v oblasti východní Afriky, v Etiopii. Z výsledků testů vyplývá, že druh *Sergentomyia schwetzi* je ochotný sát na skotu, ovcích a kozách. Minimálně pak sají na oslech a psech. Výsledek s psími séry je velice diskutabilní, jelikož byla publikována práce, kde se naopak autoři domnívají, že pes jakožto hostitel je pro *S. schwetzi* velmi atraktivní (Hassan and kol. 2009).

Navíc v oblasti východní Afriky je *S. schwetzi* známá tím, že se vyskytuje v okolí lidských obydlí, některé práce uvádějí i odchyty přímo v budovách. Mimo to se pozorováním prokázalo, že je také antropofilní (Quate 1964, Hailu and kol. 1995, Gebre-Michael and kol. 2007). Tím, že v sousedních státech uvažují o jiných druzích sergentomyií (*S. garnhami*, *S. ingrami*) jako o možných vektorech lidských leishmanióz (Mutinga and kol. 1994b, Schaefer and Kurtzhals 1994) a v Etiopii je *S. schwetzi* flebotomem hojného výskytu, nabízí se otázka za, zda by také nemohla být zapojená do přenosu *Le. donovani*

v této oblasti. S tím také souvisí to, že v odchycených exemplářích *S. schwetzi* byly identifikovány promastigotní infekce leishmaniového typu (Kaddu 1986, Mutinga 1986).

Tématu přenosu lidských leishmanióz rodem *Sergentomyia* se věnuje v posledních letech více a více pozornosti. Pomocí molekulárních metod byla opakovaně nalezená DNA lidských druhů leishmanií v různých druzích sergentomyií (Mukherjee and kol. 1997, Campino and kol. 2013, Kanjanopas and kol. 2013). Navíc v práci z roku 2012 byla ve střevě *S. darlingi* zároveň prokázána DNA *Le. major* i člověka (Berdjane-Brouk and kol. 2012).

Tyto práce však zpochybňují studie dalších autorů. Shatova a kolegové ve své práci z roku 1991 tvrdí, že ve flebotomech rodu *Sergentomyia* nejsou savčí leishmanie schopné vývoje, z důvodu širší peritrofické matrix než je po sání krve přítomna u rodů *Phlebotomus* a *Lutzomyia* (Shatova and kol. 1991 shrnuto podle Sadlova and kol. 2013). Lawyer a kolegové tuto teorii o rok dříve demonstrovali na modelu infekce *S. schwetzi*-*Le. major*. *Leishmania major* v experimentálně nakažených sergentomyiích se jistou dobu málo množily, nebyly schopné přežít ve střevě více jak 90 hodin po nákaze (Lawyer and kol. 1990).

V roce 2013 byla vydána studie na téma vývoje infekcí *Le. major*, *Le. donovani* a *Le. infantum* v *S. schwetzi*. Žádný z těchto třech druhů leishmanií nebyl ve střevě *S. schwetzi* schopný přežít defekaci nestrávených zbytků krve a invadovat do předního střeva, což je nezbytné pro nákazu případného hostitele (Sadlova and kol. 2013).

Zajímavým pohled na přenos leishmanií přináší práce z roku 2011, která popisuje první autochtoní výskyt leishmaniózy u klokanů červených v Austrálii, mezi kterými jsou pravděpodobně za přenos leishmanií zodpovědní tiplíci (Ceratopogonidae) podrodu *Forcipomyia* (Dougall and kol. 2011).

Pro úspěšný přenos leishmanií musí daný vektor splňovat několik podmínek. Jelikož se promastigotní stádia leishmanií vyvíjejí v nasátých samicích, je nutné, aby pro možnost infikování dalšího hostitele přežily fázi trávení krve, kdy nesmí dojít k jejich defekaci spolu s nestrávenými složkami krve. Tato fáze přenosu leishmanií vektorem zahrnuje i problematickou část, kdy musí patogen uniknout z peritrofické matrix. Důležité také je aby případný vektor sál na vhodných hostitelích, z čehož plyne, že hostitel flebotoma i leishmanie musí mít stejné oblasti rozšíření. Pro úspěšnou cirkulaci leishmanií v oblasti jsou důležití i rezervoároví hostitelé, ve kterých jejich vývoj může, ale i nemusí

pokračovat. Dalším faktorem ovlivňujícím úspěšnost přežívání nákazy v určité populaci je hustota populace hostitelů a případných vektorů (Ready 2013).

Druhá část této diplomové práce byla zaměřena na problematiku viscerální leishmaniózy v Rumunsku. V oblasti Evropy způsobuje VL *Le. infantum* (komplex *Le. donovani*), u které jakožto charakteristické antropozoonózy je rezervoárovým zvířetem pes domácí a jiné psovitě šelmy. Tím, že zde psi žijí v těsné blízkosti lidí, vzniká riziko propuknutí autochtonní epidemie VL mezi lidmi. Avšak i přes tento jev je v Rumunsku za poslední roky hlášeno minimum případů onemocnění lidí VL. Poslední endemické ohnisko VL bylo hlášeno z jihozápadní oblasti Rumunska, kde na VL zemřelo během několika let 24 lidí (WHO 2013). Avšak v posledních letech byl zaznamenán nárůst importovaných případů VL z jiných zemí Evropy (Neghina and kol. 2009).

Díky získaným sérům a DNA z krve psů ze třech různých částí Rumunska (jihozápadní region Banát, jihovýchodní oblast Delty Dunaje, oblast středního Rumunska – Transylvánie) jsme mohli ověřit, zda jsou psi v těchto lokalitách infikováni *Le. infantum*.

Pro stanovení hladin protilátek proti *Le. infantum* v sérech psů, bylo využito sérologického vyšetření ELISA, kdy se jako antigen používá korpuskulární antigen *Leishmania infantum*. Jako pozitivní kontroly byla zvolena séra psů z italské studie (Vlkova and kol. 2011). Negativní kontrola byla zvolena stejně jako v etiopské části pokusů – séra *Leishmania*-negativních laboratorních psů z Německa. K negativní kontrole byla navíc přidána tři séra *Le. infantum*-negativních psů z Itálie ze stejné studie, jako byla séra pozitivní. Takto jsme otestovali 238 sér, ze kterých bylo 85,7 % pozitivních. Avšak hodnota cut-off stanovená z negativních sér, byla velice vysoká. Přes pokusy optimalizovat metodu ELISA, jsme naměřili nezvykle vysoké hodnoty hladin protilátek i u negativních kontrol. Po získání nových negativních sér bychom proto chtěli tento test zopakovat.

I přesto měla séra z Banátu i Delty Dunaje protilátkovou odpověď na *Le. infantum* signifikantně vyšší než psi laboratorní. Mezi vzorky z Transylvánie a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl.

Pro přímý důkaz nakaženosti psů jsme zvolili PCR metodu. V DNA z krve psů jsme chtěli identifikovat DNA *Leishmania* sp. pomocí nested PCR, která je citlivější metodou než normální PCR. Žádný z 214 DNA vzorků nebyl pozitivní na přítomnost leishmaniové DNA. I přes to, že je nested PCR velmi senzitivní, pravděpodobnost zachytu leishmanií v krvi je

velmi malá, pro tuto metodu se lépe hodí vzorky DNA odebrané z kožních lézí v případě KL, biopsie sleziny, či výtěr spojivky (Lachaud and kol. 2001, Bensoussan and kol. 2006)(Maia and kol. 2009).

Výsledky jak z diagnostiky *Leishmania infantum* pomocí ELISA metody tak i PCR amplifikace leishmaniové DNA je těžké souhrnně interpretovat. Většina testovaných sér psů pomocí ELISA metody vyšla pozitivně, zatímco vzorky DNA testované pomocí PCR amplifikace negativně, proto je nutné testy zopakovat a případně zkusit jiné metody diagnostiky. Jednou z nich by mohla být IFAT, kterou jsme původně zamýšleli séra rumunských psů testovat. Poté co jsme vyhodnotili všechny DNA vzorky jako negativní, rozhodli jsme se, že případné IFAT testy budou jedním z předmětů Ph.D. práce.

Metoda IFAT byla použita ve studii, kde Hamel and kol. (2012) diagnostikoval *Le. Infantum* u 109 psů z Rumunska, avšak jen 4 psi byli sérologicky pozitivní (Hamel and kol. 2012). V případě sérodiagnózy *Le. infantum* u psů je celkově výhodné používat ELISA metodu, či další serologické metody, jako jsou zmíněné IFAT či DAT (Direct Agglutination Test), jelikož jsou schopné odhalit i asymptomatické nákazy leishmaniemi. Avšak stejně jako u využití metody ELISA u stanovení protilátek proti slinám flebotomů, jsou nevýhodou případné zkřížené reakce s dalšími druhy patogenů, navíc od sebe není pomocí těchto metod možné rozeznat jednotlivé druhy *Leishmania* sp. (de Arruda and kol. 2013). Výjimkou je použití specifického antigenu *Le. Infantum* rK39, který je vůči protilátkám velice senzitivní a dá se využít jak pro psy, tak i lidi (Ozensoy and kol. 1998).

Jelikož není situace *Le. infantum* v Rumunsku, tak závažná jako v jiných částech Evropy, nevěnuje se jí tolik pozornosti. Pro správnou lepší interpretaci našich výsledků, je třeba v testování pokračovat a získat tak více informací o rozšíření a intenzitě nákazy rumunských psů *Le. infantum*.

6. Závěr

V této práci jsme detekovali protilátky typu IgG proti slinným antigenům flebotoma *Sergentomyia schwetzi* u pěti druhů domácích zvířat z ohnisek s endemickým výskytem viscerální leishmaniózy v severní a severozápadní Etiopii. U všech zvířat byly zaznamenány pozitivní vzorky proti kontrolním sadám vzorků z oblastí s neendemickým výskytem flebotomů. Avšak signifikantně vyšší hladiny anti-*S. schwetzi* protilátek byly zaznamenány jen u skotu, koz a ovcí. Signifikantní rozdíl hladin protilátek nebyl mezi séry psů a oslů z Etiopie a kontrolními séry.

Dalšími pokusy, v této práci, jsme ověřovali zkřížené reakce slinných antigenů a protilátek *S. schwetzi*, *Phlebotomus orientalis* a dalších vybraných druhů flebotomů. V pokusech na psím modelu jsme ověřovali zkříženou reakci mezi protilátkami *P. perniciosus* a *L. longipalpis* se slinnými antigeny *S. schwetzi* a *P. orientalis*. Ke zkříženým reakcím nedošlo v případě testování antigenu *S. schwetzi* jak s protilátkami proti *P. perniciosus*, tak i s protilátkami proti *L. longipalpis*. Stejně tak tomu bylo i v případě antigenu *P. orientalis*. V druhé sadě pokusů jsme použili séra ze specificky imunizovaných myší *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. duboscqi*, *P. orientalis*, která jsme testovali na antigenu *S. schwetzi*. V tomto případě vykazovaly vyšší hladiny protilátek reagujících na *S. schwetzi* antigen séra obsahující protilátky proti slinám *P. papatasi* a *P. duboscqi*, zatímco séra s protilátkami proti slinám *P. orientalis* a *P. perniciosus* reagovala minimálně.

Ačkoliv je o rodu *Sergentomyia* známo, že pro sání krve spíše vyhledává studenokrevné obratlovce, dokázali jsme pomocí sérologických pokusů, že saje i na teplokrevných obratlovcích – domácí zvířata z Etiopie. Z čehož se je možné vyvodit, že by *S. schwetzi* mohla být zapojená do přenosu viscerální leishmaniózy v Etiopii. Avšak tyto výsledky je nutné brát s jistou rezervou, jelikož mohou být ovlivněny zkříženými reakcemi s jinými druhy flebotomů, či krevsajícího hmyzu. Problematice zkřížených reakcí rodu *Sergentomyia* by se mělo v dalších studiích věnovat více pozornosti. Objasnění tohoto problému by mohla pomoci také bližší charakterizace složení slinných proteinů tohoto rodu, například pomocí transkriptomické analýzy jejíž problematice se budu věnovat ve svém dalším studiu.

Druhá část této diplomové práce byla věnována problematice viscerální leishmaniózy psů v Rumunsku. Pomocí serologické metody jsme testovali přítomnost protilátek proti *Le. infantum* v sérech psů z lokalit s hlášeným výskytem psí leishmaniózy. Výsledné hladiny protilátek byly u všech vzorků nezvykle vysoké a většina psů měla pozitivní titry protilátek na *Le. infantum*. Proto jsme použili druhou diagnostickou metodu, kdy jsme pomocí *Leishmania*-specifické PCR amplifikace rozeznávali v krvi ze psů DNA *Leishmania* sp. Ani jeden z testovaných vzorků nebyl pozitivní. Z dosažených výsledků je bez doprovodných studií těžko formulovat hypotézu o prevalenci *Le. infantum* u psů v Rumunsku. Pro další testy by bylo vhodné využít specifitější metody diagnostiky jako je například IFAT.

7. Seznam použité literatury

- Adler, S., and O. Theodor. 1957.** Transmission of Disease Agents by Phlebotomine sand Flies. *Annual Review of Entomology*. 2: 203–226.
- Ali, A., and R. W. Ashford. 1994.** Visceral leishmaniasis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence and relation of infection to disease in an endemic area. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 88: 289–293.
- Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Cañavate, J.-P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. López-Vélez, and J. Moreno. 2008.** The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical microbiology reviews*. 21: 334–359.
- Alvar, J., C. Cañavate, R. Molina, J. Moreno, and J. Nieto. 2004.** Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*. 57: 1–88.
- Alvar, J., I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, and M. den Boer. 2012.** Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*. 7: e35671.
- Andrade, B. B., and C. R. Teixeira. 2012.** Biomarkers for exposure to sand flies bites as tools to aid control of leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. 3: 121.
- Antinori, S., L. Schifanella, and M. Corbellino. 2012.** Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 31: 109–118.
- De Arruda, M. M., F. B. Figueiredo, F. A. Cardoso, R. M. Hiamamoto, J. C. M. Brazuna, M. R. F. de Oliveira, E. F. Noronha, and G. A. S. Romero. 2013.** Validity and Reliability of Enzyme Immunoassays Using *Leishmania major* or *L. infantum* Antigens for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PloS one*. 8: e69988.
- Artemiev 1980, Killick-Kendrick, R. 1999.** The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*. 17: 279–289.
- Ashford, R. 1974.** Sandflies (Diptera: Phlebotomidae) from Ethiopia: taxonomic and biological notes. *Journal of medical entomology*. 11: 605–616.
- Ashford, R. W. 1996.** Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in dermatology*. 14: 523–532.
- Basak, S., A. Mondal, S. Polley, S. Mukhopadhyay, and D. Chattopadhyay. 2007.** Reviewing Chandipura: a vesiculovirus in human epidemics. *Bioscience reports*. 27: 275–298.
- Bashaye, S., N. Nombela, D. Argaw, A. Mulugeta, M. Herrero, J. Nieto, C. Chicharro, C. Cañavate, P. Aparicio, I. D. Vélez, J. Alvar, and C. Bern. 2009.** Risk factors for visceral leishmaniasis in a new epidemic site in Amhara Region, Ethiopia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 81: 34–39.

- Basimike, M., and M. J. Mutinga. 1990.** Temperature and moisture content of soils of termite mounds and animal burrows in relation to relative abundance of adult Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Marigat semiarid area, Baringo District, Kenya. *Environmental entomology*. 19: 486–489.
- Basimike, M., M. J. Mutinga, R. Kumar, and D. Munyinyi. 1992.** Relative abundance of adult phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in relation to soil characteristics of their breeding sites in Baringo District, Kenya. *Environmental Entomology*. 21: 1114–1120.
- Bates, P. A. 2007.** Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*. 37: 1097–1106.
- Beklemishev, V. N. 1957.** [Some general problems of the biology of blood-sucking lower Diptera.]. *Medical parasitology (Moskva)*. 26: 562–566.
- Belova, E. M. 1971.** Reptiles and their importance in the epidemiology of leishmaniasis. *Bulletin of the World Health Organization*. 44: 553–560.
- Bensoussan, E., A. Nasereddin, L. F. Schnur, C. L. Jaffe, E. Bensoussan, A. Nasereddin, F. Jonas, L. F. Schnur, and C. L. Jaffe. 2006.** Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. 44.
- Berdjane-Brouk, Z., A. K. Koné, A. a Djimdé, R. N. Charrel, C. Ravel, P. Delaunay, P. del Giudice, A. Z. Diarra, S. Doumbo, S. Goita, M. a Thera, J. Depaquit, P. Marty, O. K. Doumbo, and A. Izri. 2012.** First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia* (*Spelaemyia*) *darlingi* from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. *PloS one*. 7: e28266.
- Berhe, N., a Hailu, Y. Abraham, Y. Tadesse, K. Breivik, and Y. Abebe. 2001.** Inter-current and nosocomial infections among visceral leishmaniasis patients in Ethiopia: an observational study. *Acta tropica*. 80: 87–95.
- Bettini, S., and P. Melis. 1988.** Leishmaniasis in Sardinia. III. Soil analysis of a breeding site of three species of sandflies. *Medical and veterinary entomology*. 2: 67–71.
- Bhattarai, N. R., G. Van der Auwera, S. Rijal, A. Picado, N. Speybroeck, B. Khanal, S. De Doncker, M. L. Das, B. Ostyn, C. Davies, M. Coosemans, D. Berkvens, M. Boelaert, and J. C. Dujardin. 2010.** Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. *Emerging infectious diseases*. 16: 231–237.
- Brewster, S., and D. C. Barker. 1999.** The ATPase subunit 6 gene sequence predicts that RNA editing is conserved between lizard- and human-infecting *Leishmania*. *Gene*. 235: 77–84.
- Campino, L., S. Cortes, and L. Dionísio. 2013.** The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108: 516–518.
- Croan, D. G., D. a Morrison, and J. T. Ellis. 1997.** Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and biochemical parasitology*. 89: 149–159.

- Davidson, I. H. 1979.** Studies of southern African sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): the subgenus *Sintonius* of *Sergentomyia* with description of a new subgenus. *Madoqua*. 2: 217–227.
- Davidson, I. H. 1980.** *Sergentomyia transvaalensis*, an aberrant phlebotomine from southern Africa (Diptera: Psychodidae). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*. 43: 65–70.
- Davidson, I. H. 1982.** The taxon *Parvidens* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) with description of new species from Namibia. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*. 45: 105–108.
- Davidson, I. H. 1983.** The subgenus *Capesomyia* of *Sergentomyia* (Diptera: Phlebotominae): two new species from South Africa and Namibia, with a key to all known species. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*. 70: 217–224.
- Davidson, R. N. 2005.** Leishmaniasis. *Medicine*. 33: 43–46.
- Depaquit, J., M. Grandadam, F. Fouque, P. E. Andry, and C. Peyrefitte. 2010.** Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 15: 19507.
- Dohm, D. J., E. D. Rowton, P. G. Lawyer, M. O. Guinn, and M. J. Turell. 2000.** Laboratory Transmission of Rift Valley Fever Virus by *Phlebotomus duboscqi*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti*, and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*. 37: 435–438.
- Dougall, A. M., B. Alexander, D. C. Holt, T. Harris, A. H. Sultan, P. a Bates, K. Rose, and S. F. Walton. 2011.** Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International journal for parasitology*. 41: 571–579.
- Drahota, J., M. Lipoldová, P. Volf, and I. Rohousová. 2009.** Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite immunology*. 31: 766–70.
- Duport, M., G. Lupaşcu, and A. Cristescu. 1971.** [Study of phlebotomi from natural biotopes of Rumania]. *Archives roumaines de pathologie expérimentales et de microbiologie*. 30: 387–398.
- Elnaïem, D. a, M. M. Hassan, R. Maingon, G. H. Nureldin, a M. Mekawi, M. Miles, and R. D. Ward. 2001.** The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Parasitology*. 122: 531–536.
- Elnaïem, D.-E. a. 2011.** Ecology and control of the sand fly vectors of *Leishmania donovani* in East Africa, with special emphasis on *Phlebotomus orientalis*. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology*. 36: 23–31.

- Van Eys Guillaume J.J.M., G. J. Schoone, N. C. M. Kroon, and S. B. Ebeling. 1992.** Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 51: 133–142.
- Fontenille, D., M. Traore-Lamizana, J. Trouillet, A. Leclerc, M. Mondo, Y. Ba, J. P. Digoutte, and H. G. Zeller. 1994.** First isolations of arboviruses from phlebotomine sand flies in West Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 50: 570–574.
- Fuller, G. K., A. Lemma, T. Haile, and N. Gemed. 1979.** Kala-azar in Ethiopia: survey of south-west Ethiopia. The Leishmanin skin test and epidemiological studies. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 73: 417–430.
- Găman, A., C. Dobrea, and G. Găman. 2010.** A case of visceral leishmaniasis in Oltenia region (Romania). *Romanian journal of morphology and embryology*. 51: 391–394.
- Gebre-Michael, T., M. Balkew, T. Alamirew, N. Gudeta, and M. Reta. 2007.** Preliminary entomological observations in a highland area of Amhara region, northern Ethiopia, with epidemic visceral leishmaniasis. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 101: 367–370.
- Gebre-Michael, T., M. Balkew, a Ali, a Ludovisi, and M. Gramiccia. 2004.** The isolation of *Leishmania tropica* and *L. aethiopica* from *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) species (Diptera: Psychodidae) in the Awash Valley, northeastern Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 98: 64–70.
- Gebre-Michael, T., M. Balkew, N. Berhe, A. Hailu, and Y. Mekonnen. 2010.** Further studies on the phlebotomine sandflies of the kala-azar endemic lowlands of Humera-Metema (north-west Ethiopia) with observations on their natural blood meal sources. *Parasites & vectors*. 3: 6.
- Gebre-Michael, T., and R. P. Lane. 1996.** The roles of *Phlebotomus martini* and *P. celiae* (Diptera: Phlebotominae) as vectors of visceral leishmaniasis in the Aba Roba focus, southern Ethiopia. *Medical and veterinary entomology*. 10: 53–62.
- Geevarghese, G., V. A. Arankalle, R. Jodi, P. C. Kanojia, M. V Joshi, and A. C. Mishra. 2005.** Detection of chandipura virus from sand flies in the genus *Sergentomyia* (Diptera: Phlebotomidae) at Karimnagar District, Andhra Pradesh, India. *Journal of medical entomology*. 42: 495–6.
- Hailu, a, M. Balkew, N. Berhe, S. E. Meredith, and T. Gemetchu. 1995.** Is *Phlebotomus* (*Larrousius*) *orientalis* a vector of visceral leishmaniasis in south-west Ethiopia? *Acta tropica*. 60: 15–20.
- Hambuch, T. M., S. A. Handley, B. Ellis, J. Chamberlin, S. Romero, and R. Regnery. 2004.** Population Genetic Analysis of *Bartonella bacilliformis* Isolates from Areas of Peru Where Carrion ' s Disease Is Endemic and Epidemic. *Journal of clinical microbiology*. 42: 3675–3680.
- Hamel, D., C. Silaghi, D. Lescai, and K. Pfister. 2012.** Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitology research*. 110: 1537–45.

- Hassan, M. M., O. F. Osman, F. M. El-Raba'a, H. D. Schallig, and D.-E. a Elnaiem. 2009.** Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasites & vectors*. 2: 26.
- Herrero, M., G. Orfanos, D. Argaw, A. Mulugeta, P. Aparicio, F. Parreño, O. Bernal, D. Rubens, J. Pedraza, M. A. Lima, L. Flevaud, P. P. Palma, S. Bashaye, J. Alvar, and C. Bern. 2009.** Natural history of a visceral leishmaniasis outbreak in highland Ethiopia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 81: 373–377.
- Hintze, J. 1996.** NCSS 6.0.21. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com.
- Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar, and M. Boelaert. 2007.** Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology*. 5: 873–882.
- Charrel, R. N., A. Izri, S. Temmam, X. de Lamballerie, and P. Parola. 2006.** Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* flies. *Emerging infectious diseases*. 12: 1299–300.
- Kaddu, J. B. 1986.** *Leishmania* in Kenyan Phlebotominae sandflies: 3. Advances in the investigations of vectorial capacity and vector-parasite relationship of various species of sandflies in Kenya. *Insect Science and Its Application*. 7: 207–212.
- Kaddu, J. B., and M. J. Mutinga. 1984.** *Leishmania* in Kenyan phlebotomine sandflies—II. Natural infection in the malpighian tubules of *Sergentomyia garnhami* and *Sergentomyia antennatus*. *International Journal of Tropical Insect Science*. 5: 239–243.
- Kanjanopas, K., S. Siripattanapipong, U. Ninsaeng, A. Hitakarun, S. Jitkaew, P. Kaewtaphaya, P. Tan-Ariya, M. Mungthin, C. Charoenwong, and S. Leelayoova. 2013.** *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. *BMC infectious diseases*. 13: 333.
- Killick-Kendrick, R. 1990.** Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*. 4: 1–24.
- Killick-Kendrick, R. 1999.** The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*. 17: 279–289.
- Kolaczinski, J. H., D. T. Worku, F. Chappuis, R. Reithinger, N. Kabatereine, A. Onapa, and S. Brooker. 2007.** Kala-azar control, Uganda. *Emerging infectious diseases*. 13: 507–509.
- Kostalova, T. 2012.** Protilátky proti slinám flebotomov u domácích zvířat z endemických oblastí viscerální leishmaniózy. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra parazitologie. počet stran: 71.
- Lachaud, L., E. Chabbert, P. Dubessay, J. Reynes, J. Lamothe, P. Bastien, L. Lachaud, E. Chabbert, P. Dubessay, J. Reynes, J. Lamothe, and P. Bastien. 2001.** Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood.

- Lambert, M., J. Dereure, S. H. El-Safi, B. Bucheton, A. Dessein, M. Boni, E. Feugier, and J.-P. Dedet. 2002.** The sandfly fauna in the visceral-leishmaniasis focus of Gedaref, in the Atbara-River area of eastern Sudan. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 96: 631–6.
- Lane, R. 1993.** Sandflies (Phlebotominae)., pp. 78–119. *In* Lane, R., Crosskey, R. (eds.), *Medical Insects and Arachnids*. Chapman & Hall, London.
- Lawyer, P. G., P. M. Ngumbi, C. O. Anjili, S. O. Odongo, Y. B. Mebrahtu, J. I. Githure, D. K. Koech, and C. R. Roberts. 1990.** Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 43: 31–43.
- Lewis, D. 1982.** A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*. 45: 121–209.
- Lewis, D. J., D. G. Young, G. B. Fairchild, and D. M. Minter. 1977.** Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology*. 2: 319–332.
- Lewis, D., and R. Kirk. 1951.** The sandflies (Phlebotominae) of the Anglo-Egyptian Sudan. *Bulletin of entomological research*. 41: 563–575.
- Maia, C., J. Ramada, J. M. Cristóvão, L. Gonçalves, and L. Campino. 2009.** Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 179: 142–4.
- Manson-Bahr and Heisch 1961 Belova, E. M. 1971.** Reptiles and their importance in the epidemiology of leishmaniasis. *Bulletin of the World Health Organization*. 44: 553–560.
- Maroli, M., M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel, and L. Gradoni. 2013.** Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*. 27: 123–147.
- Minter, D., and D. Wijers. 1963.** Studies on the vector of kala-azar in Kenya. IV. Experimental evidence. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 57: 24–31.
- Mukherjee, S., M. Q. Hassan, A. Ghosh, K. N. Ghosh, A. Bhattacharya, and S. Adhya. 1997.** Short report: *Leishmania* DNA in *Phlebotomus* and *Sergentomyia* species during a kala-azar epidemic. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 57: 423–5.
- Mukhopadhyay, J., K. Ghosh, and H. R. Braig. 2000.** Identification of cutaneous Leishmaniasis vectors, *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi* using random amplified polymorphic DNA. *Acta tropica*. 76: 277–83.
- Mutinga, M. J. 1986.** Epidemiology of leishmaniasis in Kenya. *Advances in research on vectors and animal reservoirs, and possible control measures. International Journal of Tropical Insect Science*. 7: 199–206.
- Mutinga, M. J., N. N. Massamba, M. Basimike, C. C. Kamau, F. A. Amimo, A. E. Onyido, D. M. Omogo, F. M. Kyai, and D. W. Wachira. 1994a.** Cutaneous leishmaniasis in Kenya:

- Sergentomyia garnhami* (Diptera, Psychodidae), a possible vector of *Leishmania major* in Kitui district: A New focus of the disease. *East African medical journal*. 71: 424–428.
- Mutinga, M. J., N. N. Massamba, M. Basimike, C. C. Kamau, F. A. Amimo, A. E. Onyido, D. M. Omogo, F. M. Kyai, and D. W. Wachira. 1994b.** Cutaneous leishmaniasis in Kenya: *Sergentomyia garnhami* (Diptera Psychodidae), a possible vector of *Leishmania major* in Kitui District: a new focus of the disease. *East African medical journal*. 71: 424–8.
- Mutinga, M., F. M. Kyai, and D. M. Omogo. 1986.** Investigations on the epidemiology of leishmaniasis in Kenya—I. Studies on vectors of *Leishmania major* in Marigat, Baringo District, Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science*. 7: 181–189.
- Neghina, R., A. M. Neghina, I. Marincu, and I. Iacobiciu. 2011.** Epidemiology and history of human parasitic diseases in Romania. *Parasitology research*. 108: 1333–1346.
- Neghina, R., A.-M. Neghina, C. Merkler, I. Marincu, R. Moldovan, and I. Iacobiciu. 2009.** Importation of visceral leishmaniasis in returning Romanian workers from Spain. *Travel medicine and infectious disease*. 7: 35–39.
- Ngumbi, P. M., J. C. Kaburi, C. O. Anjili, and F. Haas. 2010.** *Phlebotomus* (Larroussius) *orientalis* (Diptera: Psychodidae) as a probable secondary vector of visceral leishmaniasis in Kenya. *Journal of vector borne diseases*. 47: 58–60.
- Ngumbi, P. M., P. G. Lawyer, R. N. Johnson, G. Kiilu, and C. Asiago. 1992.** Identification of phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo District, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Medical and veterinary entomology*. 6: 385–388.
- Ngure, P. K., A. Kimutai, Z. W. Ng'ang'a, G. Rukunga, and W. K. Tonui. 2009.** A review of Leishmaniasis in Eastern Africa. *Journal of Nanjing Medical University*. 23: 79–86.
- Orlando, T. C., M. A. T. Rubio, N. R. Sturm, D. a Campbell, and L. M. Floeter-Winter. 2002.** Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97: 695–701.
- Ozensoy, S., Y. Ozbel, N. Turgay, M. Z. Alkan, K. Gul, a Gilman-Sachs, K. P. Chang, S. G. Reed, and M. a Ozcel. 1998.** Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 59: 363–9.
- Parvizi, P., and A. Amirkhani. 2008.** Mitochondrial DNA characterization of *Sergentomyia sintoni* populations and finding mammalian *Leishmania* infections in this sandfly by using ITS-rDNA gene. *Iranian Journal of Veterinary*. 9: 9–18.
- Perfilev, P. 1968.** *Phlebotomidae* (sandflies). Translation of Perfilev 1966 (*Fauna of USSR Diptera*. Vol. 3. No. 2. 93: 1-382) [Russian] by Israel Program of Scientific Translations, Jerusalem.
- Poche, R. M., R. Garlapati, D.-E. a Elnaiem, D. Perry, and D. Poché. 2012.** The role of *Palmyra* palm trees (*Borassus flabellifer*) and sand fly distribution in northeastern India. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology*. 37: 148–53.

- Quate, L. W. 1964.** Phlebotomus sandflies of the Paloich area in the Sudan (Diptera, Psychodidae). *Journal of medical entomology*. 1: 213–268.
- Ready, P. D. 2013.** Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual review of entomology*. 58: 227–250.
- Rohousova, I., and P. Volf. 2006.** Sand fly saliva: effects on host immune response and Leishmania transmission. *Folia parasitologica*. 53: 161–71.
- Sadlova, J., V. Dvorak, V. Seblova, A. Warburg, J. Votypka, and P. Volf. 2013.** *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. *Parasites & vectors*. 6: 186.
- Seaman, J., a J. Mercer, H. E. Sondorp, and B. L. Herwaldt. 1996.** Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Annals of internal medicine*. 124: 664–672.
- Secombe, A. K., P. D. Ready, and L. M. Huddleston. 1993.** A Catalogue of Old World Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Occasional Papers on Systematic Entomology*. 8: 1–58.
- Senghor, M. W., M. N. Faye, B. Faye, K. Diarra, E. Elguero, O. Gaye, A.-L. Bañuls, and A. a Niang. 2011.** Ecology of phlebotomine sand flies in the rural community of Mont Rolland (Thiès region, Senegal): area of transmission of canine leishmaniasis. *PloS one*. 6: e14773.
- Schaefer, K., and J. Kurtzhals. 1994.** Epidemiology and clinical manifestations of visceral and cutaneous leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley, Kenya: a literature review. *Tropical and geographical medicine*. 46: 129–133.
- Schaffartzik, a, E. Marti, R. Cramer, and C. Rhyner. 2010.** Cloning, production and characterization of antigen 5 like proteins from *Simulium vittatum* and *Culicoides nubeculosus*, the first cross-reactive allergen associated with equine insect bite hypersensitivity. *Veterinary immunology and immunopathology*. 137: 76–83.
- Schwarz, A., J. M. Sternberg, V. Johnston, N. Medrano-Mercado, J. M. Anderson, J. C. C. Hume, J. G. Valenzuela, G. a Schaub, and P. F. Billingsley. 2009.** Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *International journal for parasitology*. 39: 1021–1029.
- Singh, S. 2006.** New developments in diagnosis of leishmaniasis. *The Indian journal of medical research*. 123: 311–330.
- Svobodová, M., B. Alten, L. Zídková, V. Dvořák, J. Hlavacková, J. Mysková, V. Seblová, O. E. Kasap, A. Belen, J. Votýpka, and P. Volf. 2009.** Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *International journal for parasitology*. 39: 251–6.
- Tonui, W. K. 2006.** Situational analysis of leishmaniasis research in Kenya. *African journal of health sciences*. 13: 7–21.

- Vinhas, V., B. B. Andrade, F. Paes, A. Bomura, J. Clarencio, J. C. Miranda, A. Báfica, A. Barral, and M. Barral-Netto. 2007.** Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *European journal of immunology*. 37: 3111–21.
- Vlkova, M., I. Rohousova, J. Drahota, D. Stanneck, E. M. Kruedewagen, N. Mencke, D. Otranto, and P. Volf. 2011.** Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. *PLoS neglected tropical diseases*. 5: e1344.
- Volf, P., J. Hostomska, and I. Rohousova. 2008.** Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite (Paris, France)*. 15: 237–243.
- Volf, P., and I. Rohousova. 2001.** Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology*. 122: 37–41.
- Volf, P., P. Tesarova, and E. Nohynkova. 2000.** Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Medical and Veterinary Entomology*. 14: 251–256.
- Volf, P., and V. Volfova. 2011.** Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*. 36: 1–9.
- WHO. 2013.** <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. 13. srpen 2013.
- Young, D. G., and M. A. Duncan. 1994.** Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*. 54: 1–881.
- Young, D., and P. Perkins. 1984.** Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae). *Mosquito News*. 44: 263–304.
- Zahar, A. 1979.** Studies on leishmaniasis vectors/reservoirs and their control in the Old World. *WHO/VBC*. 79.749: 1–88.
- Zhang, L. M., and Y. J. Leng. 1997.** Eighty-year research of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in China (1915-1995). II. Phlebotomine vectors of leishmaniasis in China. *Parasite (Paris, France)*. 4: 299–306.